Wechselwirkungen von Phenolen mit grenzflächenaktiven Polyäthylenglykolderivaten in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Reaktionspartner

OTTO FICKEL

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0052

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Wechselwirkungen von Phenolen mit grenzflächenaktiven Polyäthylenglykolderivaten in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Reaktionspartner

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Otto Fickel

aus

Berlin

1968

München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: 1. Professorin Dr. E. ULLMANN

2. Professor Dr. Dr. h.c. E. BAMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 15.5.1968

Die vorliegende Arbeit wurde in der pharmazeutisch-technologischen Abteilung des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter der Leitung von

Frau Professorin Dr. Elsa Ullmann

durchgeführt.

Dem Direktor des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Eugen Bamann, der die Arbeit stets gefördert hat, spreche ich meinen ergebensten Dank aus.

Es ist mir ein besonderes Bedürfnis, meinen engeren akademischen Lehrern, Frau Professorin Dr. E. Ullmann und Herrn Professor Dr. K. Thoma, für das große Interesse am Fortgang meiner Arbeit zu danken.

Meiner lieben Frau

für Geduld und

Hilfsbereitschaft

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einführung	1
B.	Ergebnisse der Untersuchungen	3
I.	Charakterisierung der Reaktionspartner	3
	1. Die Phenole	3
	2. Die Polyäthylenglykolstearate	6
	3. Die Polyäthylenglykole	7
II.	Einfluß von Polyäthylenglykolen und Polyäthylenglykolstearaten auf die antibakterielle Wirkung von phenolischen Konservierungsmitteln	11
	1. Auswirkung von Polyäthylenglykolen	11
	2. Auswirkung von Polyäthylenglykolstearaten	13
	3. Quantitative Bestimmung der Wertminderungen	16
III.	Untersuchungen über die Bindung zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolstearaten	20
	1. Untersuchung mit Hilfe der Diasolyse	20
	2. Untersuchung von Fällungsreaktionen zwischen den Reaktionspartnern	26
	3. Beeinflussung der UV-Spektren von Phenolen	28
IV.	Diskussion der Ergebnisse	33
V.	Über die Verwendung nichtionischer Tenside als Lösungsvermittler phenolischer Desinfektionsmittel	35
C.	Experimenteller Teil	38
I.	Mikrobiologische Untersuchungen mit Hilfe der WARBURG-Apparatur	38
	1. Beschreibung der Versuchsanordnung	38
	2. Aktivitätsbestimmung der Phenole in Anwesenheit von Tensiden	40

Seite

II. Untersuchungen zum Verteilungsverhalten der Phenole 44

1. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten im System Ölsäuredecylester/Wasser 44

2. Gleichgewichtsdialyse im geschlossenen System 46

a) Diasolyse von Lösungen des Phenols, Kresols, o-Cl-m-Kresols, Thymols und p-Cl-m-Xylenols gegen Tensidlösung 46

b) Diasolyse tensidhaltiger ^{14}C-Hexachlorophenlösungen gegen Wasser 49

3. Diasolyse phenolhaltiger Hilfsstofflösungen gegen fließendes Wasser 54

III. Spektrographische Untersuchung von Phenolen in Anwesenheit der Tenside 56

IV. Durchführung von Fällungsreaktionen zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolstearaten 56

V. Quantitative Bestimmung der verschiedenen Phenole 57

1. UV-spektrophotometrische Bestimmung 57

2. Photometrische Bestimmung 57

3. Bestimmung von ^{14}C-Hexachlorophen in Anwesenheit von Polyäthylenglykolstearaten 58

D. Zusammenfassung 59

E. Literaturverzeichnis 62

A. Einführung

Für chemische Desinfektionsmaßnahmen sind das von LISTER eingeführte Phenol bzw. seine Derivate noch immer aktuell. Besondere Bedeutung kommt den Phenolderivaten für die Konservierung verschiedener Arzneiformen zu: So werden z.B. Phenol, Kresol, p-Cl-m-Kresol und die p-Hydroxybenzoesäureester auch in Vorschriften neuerer Arzneibücher zur Haltbarmachung von parenteralen Lösungen (Insulin, Antitoxine oder Impfstoffe) von Sirupen, Emulsionen und Emulsionssalben herangezogen.

Die begrenzte Wasserlöslichkeit der Phenole erfordert vielfach Verwendung von Lösungsvermittlern, welche den antibakteriellen Effekt allerdings drastisch beeinflussen können. Dies trifft vor allem für die nichtionogenen Polyäthylenglykolderivate zu, die wegen ihrer physiologischen Indifferenz gerne als Hilfsstoffe herangezogen werden.

Wechselwirkungen zwischen nichtionogenen Tensiden und Phenolen waren häufig Gegenstand vor allem von mikrobiologischen Untersuchungen (16, 17, 47, 60, 96). Qualitative Ausrichtung oder Beschränkung auf einzelne Stoffe erschweren jedoch den Überblick und lassen keine Verallgemeinerungen hinsichtlich der Ursachen wertmindernder Wechselwirkungen zu.

Physikalisch-chemische Untersuchungen beschränken sich auf einzelne Phenole (4, 61, 62, 71, 72), wobei im allgemeinen Vorgänge bei der Lösungsvermittlung behandelt werden. Diskussionen über die Art der Bindung zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolderivaten stützen sich auf Untersuchungen über die Zusam-

mensetzung von Phenolkomplexen mit Äthylenglykolpolymerisaten (1, 34, 42, 50). Dabei wird durch Analogieschluß die mikrobiologische Wertminderung durch Polyäthylenglykolderivate auf Wasserstoffbrückenbindung zwischen Polyäthylenlgykolkomponente des Hilfsstoffs und Hydroxyl-Funktion des Phenols zurückgeführt (10, 16, 26).

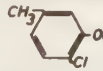
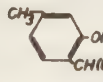
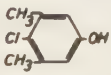
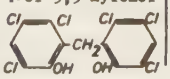
Nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur liegen zwar zahlreiche Einzelbefunde vor, sie behandeln aber aus mikrobiologischer oder physikalisch-chemischer Sicht lediglich Teilprobleme der Wechselwirkungen von phenolischen Konservierungsmitteln mit nichtionogenen Tensiden (1, 4, 24, 33, 47, 48, 71, 72). Das Ziel der Arbeit war daher, die der Wertminderung zugrundeliegenden Gesetzmäßigkeiten aufzuklären. Hierzu wurden sowohl eine größere Anzahl phenolischer Konservierungsmittel mit verschiedenartigen Eigenschaften als auch nichtionogene Tenside einer einzigen Verbindungsklasse, aber mit abgestuften amphiphilen Eigenschaften eingesetzt. Für die Bearbeitung unserer Fragestellungen war eine geeignete Kombination von quantitativen mikrobiologischen und physikalisch-chemischen Methoden zu erarbeiten und auszuwerten.

B. Ergebnisse der Untersuchungen

I. Charakterisierung der Reaktionspartner

1. Die Phenole

Gesichtspunkte für die Auswahl der Phenole waren die von der Struktur abhängigen verschiedenartigen Eigenschaften (z.B. Wasserlöslichkeit, antibakterielle Aktivität (40, 45, 87)). Aus diesem Grunde haben wir für unsere Untersuchungen die nachfolgenden Phenole herangezogen:

Phenole	Struktur	MG	Wasserlöslichkeit	Phenolkoeff. +)
Phenol		94,11	1: 11,8	1
Kresol		108,14	1: 47,5	2,5
	Gemisch aus o-, m-, p-Kresol			
o-Cl-m-Kresol		142,58	1: 255	ca 12
	6-Cl-m-Kresol			
Thymol		150,21	1: 1020	30
o-Cl-m-Xylenol		156,61	1: 2750	70
	4-Cl-3,5-Xylenol			
Hexachlorophen		406,92	1:70000	125
	2,2'-Methylen-bis (3,4,6-trichlorphenol)			

+) Ref.nach G. HAUSCHILD (40) und G. SYKES (87)

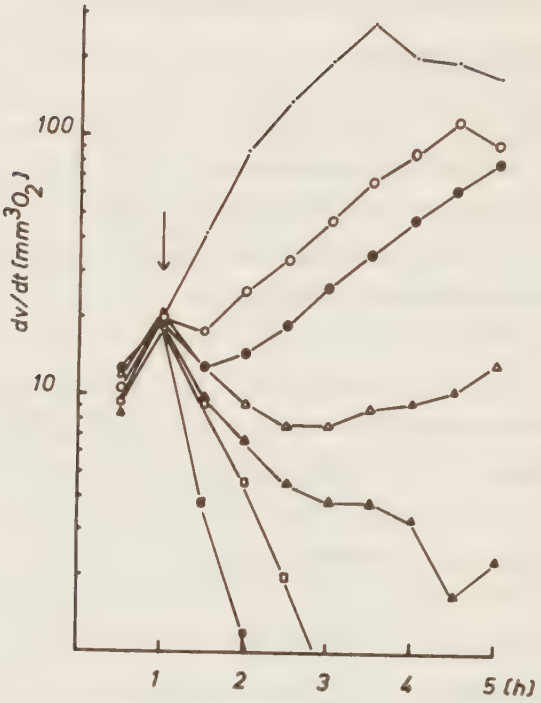


Abb.1 Einfluß verschiedener Konzentrationen von o-Cl-m-Kresol auf die Atmung von Staph. aur. SG 511

—·— Proliferationskurve des Teststammes

o-Cl-m-Kresol in %

—○— 0,0450

—●— 0,0495

—△— 0,0540

—▲— 0,0595

—□— 0,063

—■— 0,090

Zur Bestimmung der Phenolaktivität erfordert die Fragestellung unserer Arbeit eine Methode, welche gestattet, die antibakterielle Wirksamkeit dieser Konservierungsmittel auch in Anwesenheit der grenzflächenaktiven Hilfsstoffe zu differenzieren. Hierfür ist nicht der für die Ermittlung der Phenolkoeffizienten (40, 87) übliche Reihenverdünnungstest sondern ausschließlich die WARBURG-Methode geeignet. Bei Anwendung dieser Methode wird die Atmungstätigkeit von Testkeimen während einer Zeit von 5 Stunden verfolgt. Phenole beeinflussen ebenso wie andere antibakteriell wirksame Substanzen den Sauerstoffverbrauch der von uns herangezogenen Testkeime (Staph. aur. SG 511).

Die Atmungskurven verzeichnen in Abhängigkeit von der Dosis alle Übergänge von der ungehinderten Proliferation über Bakteriostase zur Bakterizidie. Die Phenolwirkung läßt sich nach W.SCHULER (84) dem Strahlentyp zuordnen (Abb. 1). Bakteriostase bedeutet das Einschwenken der Atmungskurve in die Horizontale, während Bakterizidie durch steiles Abfallen innerhalb zweier Stunden gekennzeichnet ist. Die bakteriostatischen und bakteriziden Grenzkonzentrationen der verwendeten Phenole, die sich auf diese Weise ermitteln lassen, sind in Tab. 1 angegeben. Die aufgefundenen Werte geben die gleiche Tendenz wieder (Herabsetzung der wirksamen Konzentration durch Ansteigen der Aktivität in der Reihe Phenol bis Hexachlorophen) wie sie auch in den Phenolkoeffizienten der Literatur zum Ausdruck kommt.

Phenole	Grenzkonzentrationen in % Art der Wirkung:	
	bakterizid	bakteriostatisch
Phenol	0,6	0,225
Kresol	0,22	0,14
o-Cl-m-Kresol	0,09	0,06
Thymol	0,033	0,0166
p-Cl-m-Xylenol	0,022	0,012
Hexachlorophen	0,0005	0,0001

Tab 1. Im Warburgversuch ermittelte, mikrobiologisch wirksame Grenzkonzentrationen verschiedener Phenole

2. Die Polyäthylenglykolstearate

Bei der Auswahl der Lösungsvermittler haben wir die nachfolgenden Verbindungen herangezogen:

P o l y ä t h y l e n g l y k o l s t e a r a t e

-Mol.Gew.-			
PÄG-Anteil	Ester	c_K +)	HLG ++)
- 400-	- 680-	0,16 %	11,1
- 900-	-1180-	0,016%	15,9
-2200-	-2480-	0,014%	17,9

+) c_K = Kritische Mizellbildungskonzentration

++) HLG = Hydrophiles-lipophiles Gleichgewicht

Angaben lt. Hersteller: ALTAS-GOLDSCHMIDT GmbH Essen

Diese Auswahl ermöglicht eine Variation der amphiphilen Ausrichtung. So ist das Polyäthylenglykol-400-stearat - mit der kürzesten Polyäthylenglykolkette - am wenigsten hydrophil, während Polyäthylenglykol-2200-stearat ausgeprägte hydrophile Eigenschaften besitzt. Die c_K der Polyäthylenglykole unterscheiden sich bei Polyäthylenglykol-400-stearat einerseits und den beiden anderen Stearaten andererseits um eine Zehnerpotenz.

Die Polyäthylenglykolstearate 900 und 2200 (Abb. 2) zeigen im WARBURG-Versuch bis zu Konzentrationen von 5% praktisch keinen Einfluß auf die Wachstumsrate der Bakterien. Die Atmungskurven entsprechen einer ungehinderten Proliferation. Lediglich Polyäthylenglykol-400-stearat verändert die Proliferationskurve. Der Sauerstoffverbrauch ist vor allem im Maximum (nach 3 Std.) reduziert.

3. Die Polyäthylenglykole

Für vergleichende Untersuchungen bieten sich die unveresterten, nicht grenzflächenaktiven Polyäthylenglykole an. Solche Substanzen mit den Molekulargewichten 400, 1000, 2000 und 6000 haben bis zu einer Konzentration von 5% keinen Einfluß auf die Atmung von Staph.aur. SG 511 (Abb. 3).

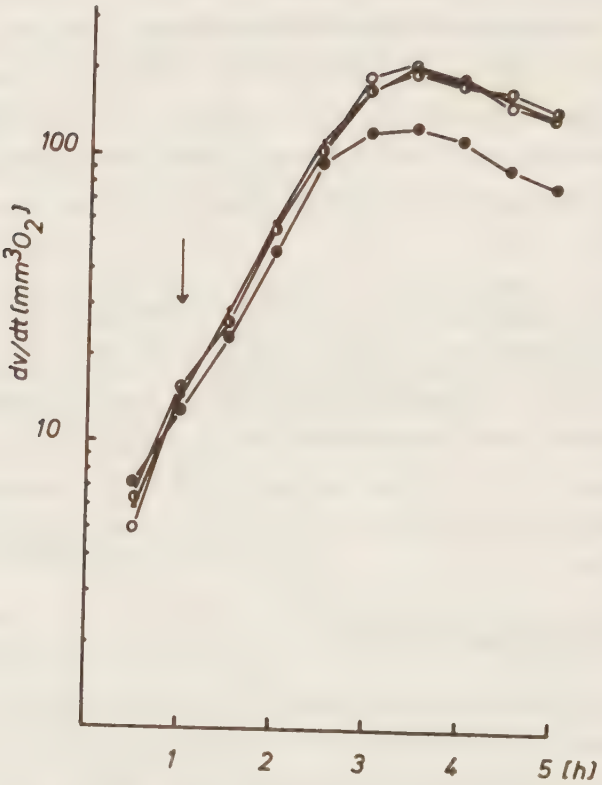


Abb. 2 Einfluß verschiedener Polyäthylenglykolstearate (5%) auf die Atmung von Staph. aur. SG 511

—·— Proliferationskurve des Teststammes

Polyäthylenglykol-MG-stearat

—o— 2200

—o— 900

—●— 400

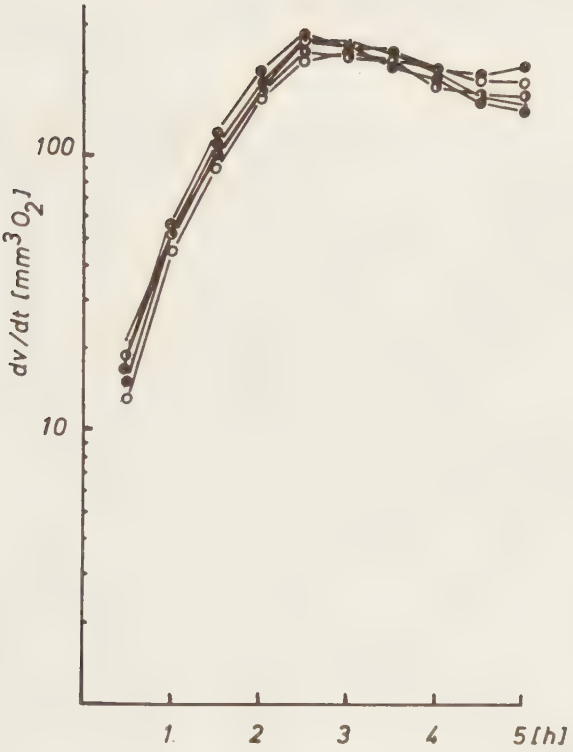


Abb. 3 Einfluß verschiedener Polyäthylenglykole auf die Atmung von Staph. aur. SG 511

—·— *Proliferationskurve des Teststammes*

Polyäthylenglykol-MG

—●— *6000*

—○— *2000*

—◐— *1000*

—◑— *400*

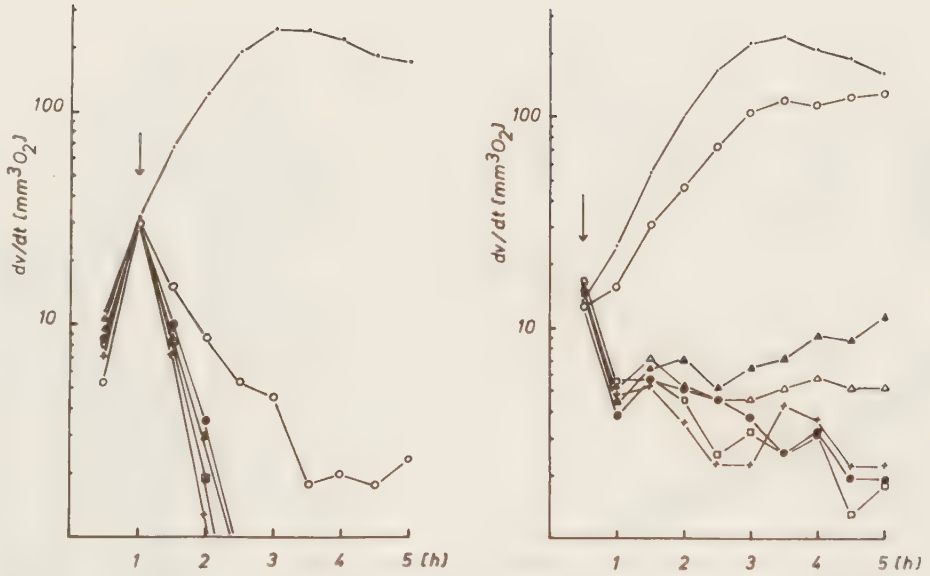


Abb. 4 Einfluß verschiedener Konzentrationen von Polyäthylenglykol-1000 auf die

a) bakterizide Wirkung von o-Cl-m-Kresol (0,09%) *b) bakteriostatische Wirkung von o-Cl-m-Kresol (0,060%)*

—·— *Proliferationskurve des Teststammes*

Zusatz von Polyäthylenglykol-1000 in %

—+—	*0*	—▲—	*0,1*
—□—	*0,001*	—●—	*1,0*
—▲—	*0,01*	—○—	*5,0*

II. Einfluß von Polyäthylenglykolen und Polyäthylenglykolstearaten auf die antibakterielle Wirkung von phenolischen Konservierungsmitteln

1. Auswirkung von Polyäthylenglykolen

Obwohl Phenole mit Polyäthylenglykolen über Protonen-Donator-Akzeptor-Wechselwirkungen zu schwer löslichen Assoziaten reagieren (10, 38, 42, 52, 71), werden nach unseren Untersuchungen die antibakteriellen Eigenschaften durch Polyäthylenglykole nur geringfügig verändert: So wird die Aktivität der untersuchten Phenole durch Polyäthylenglykole in Konzentrationen bis zu 1% nicht beeinflußt. Im Falle des Hexachlorophen gilt dies sogar bis zu 5% Hilfsstoff. Eine solche Polyäthylenglykolkonzentration führt allerdings bei Phenol, Kresol, o-Cl-m-Kresol, Thymol, p-Cl-m-Xylenol zur Verminderung der Phenolaktivität. So hat z.B. Polyäthylenglykol-1000 bis zu einem Gehalt von 1% keinen Einfluß auf die Wirksamkeit von o-Cl-m-Kresol (Abb. 4a, 4b). Die antibakterielle Wirkung bleibt in dem Grenzbereich zwischen 0,09% und 0,06% des Wirkstoffs erhalten. Erst Anwesenheit von 5% des Polyäthylenglykols vermindert die Aktivität der Phenole: Die ursprünglich bakterizide Wirkung der 0,09%igen o-Cl-m-Kresollösung reduziert sich dabei auf einen bakteriostatischen Effekt (Abb. 4a). Deutlicher zeigt sich der Einfluß des Hilfsstoffs (5%) bei Verminderung der o-Cl-m-Kresolkonzentration (0,06%). Hierbei kommt es zu einer Proliferation der Keime mit einem Kurvenverlauf, welcher mit der Testkurve fast deckungsgleich ist (Abb. 4b).

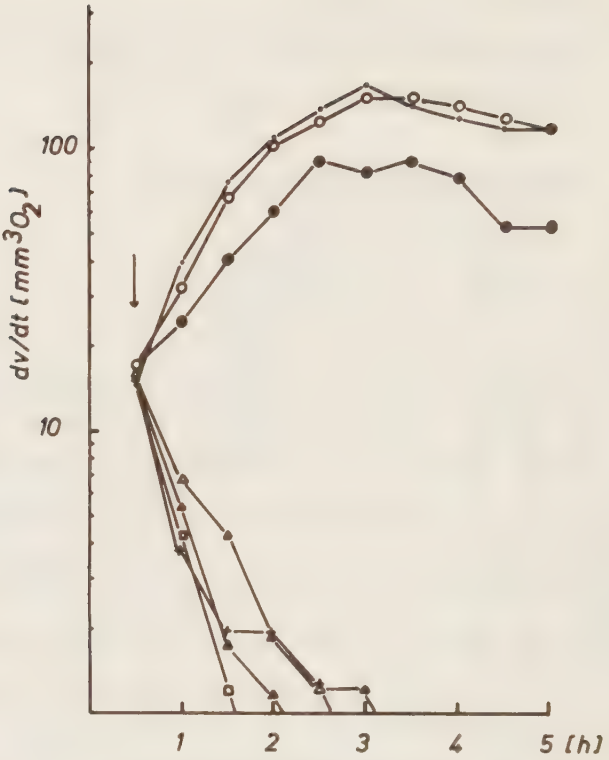


Abb. 5 Einfluß verschiedener Konzentrationen von Polyäthylenglykol-900-stearat auf die bakterizide Wirkung von o-Cl-m-Kresol (0,09%)

—•— Proliferationskurve des Teststammes

Zusatz von Polyäthylenglykol-900-stearat in %

—+— 0	—▲— 0,1
—▫— 0,001	—●— 1,0
—▲— 0,01	—o— 5,0

2. Auswirkung von Polyäthylenglykolstearaten

Grenzflächenaktive Polyäthylenglykolstearate führen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der antibakteriellen Aktivität der Phenole. Ganz allgemein zeigt sich dabei eine Wertminderung, welche der Konzentration der Polyäthylenglykolstearate proportional ist. Eine solche Verringerung der Aktivität wird jeweils durch Tensidkonzentrationen oberhalb der c_K ausgelöst.

Unterhalb dieses Bereichs wirkt sich die Anwesenheit der Tenside im allgemeinen nicht aus. Eine Ausnahme macht Polyäthylenglykol-400-stearat: Bei submizellaren Konzentrationen ist hier eine Steigerung der Phenolwirksamkeit nachweisbar.

In den Abb. 5, 6, 7 sind unsere Befunde wiederum am Beispiel o-Cl-m-Kresol in Anwesenheit von Polyäthylenglykol-900-stearat bzw. Polyäthylenglykol-400-stearat dargestellt. Bereits 1% Polyäthylenglykol-900-stearat hebt die antibakterielle Wirkung einer 0,09%igen o-Cl-m-Kresollösung auf (Abb. 5). Die Atmungskurve verläuft ähnlich wie die Testkurve (ungehinderte Proliferation). Dagegen haben geringere Hilfsstoffmengen ($< 0{,}1\%$) offenbar keinen Einfluß auf die Absterberate: Unterdrückung der Atmung durch die eingesetzte o-Cl-m-Kresol-menge erfolgt auch in Anwesenheit des Polyäthylenglykolstearats.

Nach Verringerung der o-Cl-m-Kresolkonzentration auf 0,06% ergeben sich Aktivitätsänderungen bereits durch einen Gehalt von 0,1% Polyäthylenglykolstearat. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, verlaufen Atmungskurven unter dem Einfluß von 0,01% Polyäthylenglykol-900-stearat ähnlich denjenigen ohne Hilfsstoff. Konzentrationen $> 0{,}1\%$ Polyäthylenglykol-900-stearat heben den bakteriostatischen Effekt in zunehmendem Maße auf.

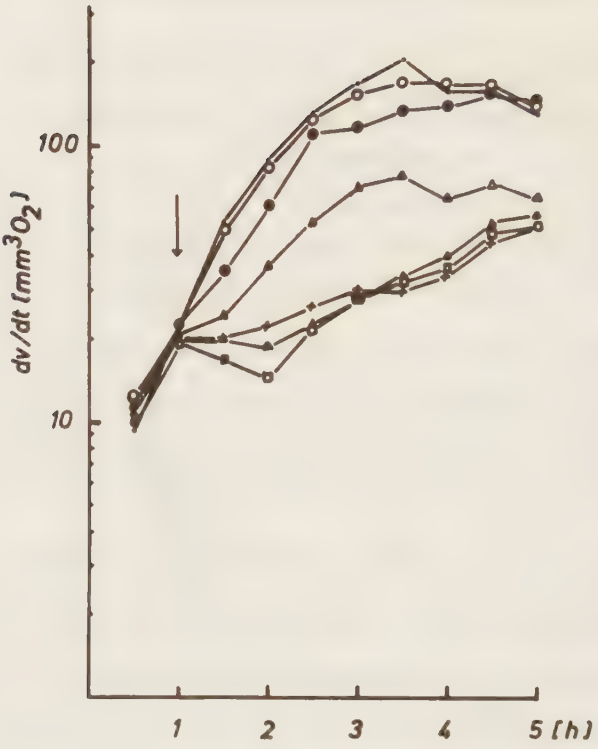


Abb. 6 *Einfluß verschiedener Konzentrationen von Polyäthylenglykol-900-stearat auf die bakteriostatische Wirkung von o-Cl-m-Kresol (0,06%)*

—·— *Proliferationskurve des Teststammes*

Zusatz von Polyäthylenglykol-900-stearat in %

—+— *0*
—▵— *0,1*
—○— *0,001*
—●— *1,0*
—▲— *0,01*
—○— *5,0*

Abb. 7 *Einfluß verschiedener Konzentrationen von Polyäthylenglykol-400-stearat auf die bakteriostatische Wirkung von o-Cl-m-Kresol (0,06%)*

—·— *Proliferationskurve des Teststammes*

Zusatz von Polyäthylenglykol-400-stearat in %

—+— *0*
—▫— *0,001*
—▲— *0,01*
—▲— *0,1*
—●— *1,0*
—○— *5,0*

Nach Literaturangaben können Tensidkonzentrationen $\leq c_K$ vielfach eine Steigerung der Arzneistoffwirksamkeit verursachen, welche durch Herabsetzung der Grenzflächenspannung zu erklären ist (12-14, 18, 19, 63). Eine solche Wirkungssteigerung durch Tenside konnten wir bei den untersuchten Phenolen im allgemeinen nicht beobachten.

Eine Ausnahme von dieser Regel betrifft die Wechselwirkung mit Polyäthylenglykol-400-stearat: Die Steigerung der Phenolaktivität muß dabei auf eine, wenn auch schwach ausgeprägte antibakterielle Wirkung dieses Tensids zurückzuführen sein (vgl. Abb. 2). So kann beobachtet werden, daß durch bakteriostatische Arzneistoffkonzentrationen in Gegenwart von Polyäthylenglykol-400-stearat unterhalb dessen c_K (c_K = 0,16%) Aufhebung der Atmungstätigkeit eintritt: Hilfsstoffkonzentrationen $\leq$ 0,1% verursachen durch additive Effekte von Arznei- und Hilfsstoff nicht nur Bakteriostase, sondern eine rasche Abtötung der Bakterieneinsaat. Erhöhung der Hilfsstoffmenge auf 1% und darüber führt zur Aufhebung der Phenolwirksamkeit (Abb. 7).

3. Quantitative Bestimmung der Wertminderungen

Über die qualitative Beurteilung hinaus ermöglicht die WARBURG-Technik auch eine quantitative Bestimmung des Aktivitätsverlustes[+)], da der Wirkungstyp (Strahlentyp, s.S.4) in Anwesenheit von Polyäthylenglykolen und Polyäthylenglykolstearaten erhalten bleibt (Abb. 8, 14). Unter Zugrundelegung von Grenzkonzentrationen des reinen Wirkstoffs ist es möglich, die Wert-

[+)] Zur Methodik s.S.40

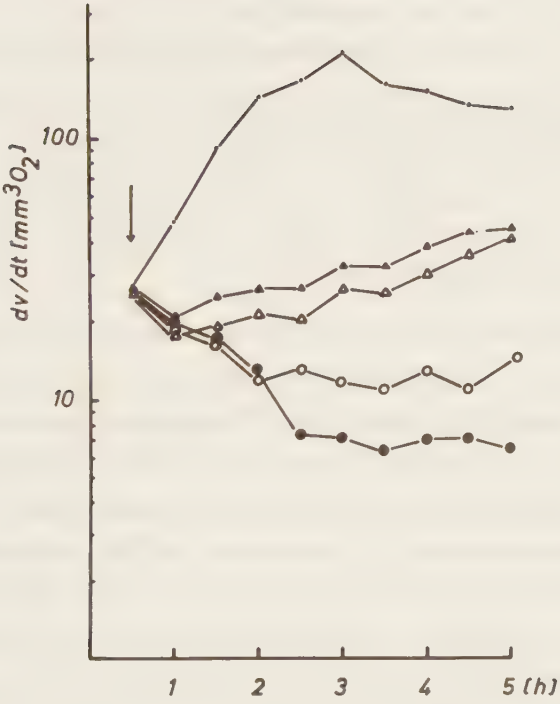


Abb. 8 *Im Warburgversuch ermittelte, mikrobiologisch wirksame Konzentrationen von o-Cl-m-Kresol ohne Hilfsstoff und nach Zusatz von Polyäthylenglykol-900-stearat (5%)*

—•— *Proliferationskurve des Teststammes ohne Hilfsstoff*

—▵— *o-Cl-m-Kresol 0,065%*

—o— *o-Cl-m-Kresol 0,070%*

nach Zusatz von Polyäthylenglykol-900-stearat (5%)

—▲— *o-Cl-m-Kresol 0,63%*

—●— *o-Cl-m-Kresol 0,72%*

minderung durch den Hilfsstoff mit einer spezifischen Erhöhung der Phenolkonzentration auszugleichen. Dabei sind Phenolkonzentrationen zu ermitteln, die zwischen bakterizider und bakteriostatischer Wirkung liegen. Aus dem Vergleich korrespondierender Versuchsansätze - ohne Hilfsstoff und in Anwesenheit von 5% der Polyäthylenglykole sowie der Polyäthylenglykolstearate - lassen sich Zahlenwerte errechnen, die die erforderliche Vervielfachung der Wirkstoffkonzentration angeben.

In Abb. 8 entsprechen die Kurvenzüge dem Sauerstoffverbrauch der Testkeime in tensidfreiem bzw. tensidhaltigem Medium. So benötigt man in Gegenwart von 5% Polyäthylenglykol-900-stearat beispielsweise 0,63% o-Cl-m-Kresol, während in tensidfreier Lösung 0,065% des Wirkstoffs ausreichen. Daraus folgt, daß die Arzneistoffkonzentration in Anwesenheit von 5% Hilfsstoff auf das 9,7fache erhöht werden muß. Praktisch gleiche Faktoren erhält man bei der Auswertung von Kurvenpaaren, denen andere Wirkstoffkonzentrationen im bakteriostatisch-bakteriziden Grenzbereich zugrunde liegen. Eine Übersicht über solche Zahlenwerte für die von uns untersuchten Phenole vermittelt Tab. 2 (s.S.19).

Der Einfluß der nichtveresterten Polyäthylglykole ist sehr gering und vom Molekulargewicht der Hilfsstoffe praktisch unabhängig. Unseren Untersuchungen zufolge erfordern Konzentrationen bis zu 5% an Polyäthylenglykol bei Phenol und Hexachlorophen keine, bei o-Cl-m-Kresol und p-Cl-m-Xylenol jeweils 1,5 bis 2fache Erhöhung der Wirkstoffkonzentration.

Ein Vergleich mit den Auswirkungen der Polyäthylenglykolstearate zeigt, daß auch hierbei dem Molekulargewicht der Polyäthylenglykolkette nur geringe Bedeutung zukommt. So ist der Einfluß der Hilfsstoffe auf die einzelnen Phenole entweder praktisch

gleich oder unterscheidet sich höchstens wie 1:2. Auftretende Abweichungen lassen keine Gesetzmäßigkeit erkennen.

Dagegen macht sich der Einfluß der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phenole auf die Wirkungsverminderung durch Polyäthylenglykolstearate viel stärker bemerkbar. Entsprechend den zunehmend lipophilen Eigenschaften der Phenole muß zur Aufrechterhaltung der ursprünglichen antibakteriellen Aktivität z.B. in Gegenwart von 5% Polyäthylenglykol-900-stearat für Phenol etwa die doppelte Menge (erforderliche Vervielfachung 2,3) aufgewendet werden. Bei Kresol ist die 4,9fache, bei o-Cl-m-Kresol die 10fache, bei Thymol die 34fache, bei p-Cl-m-Xylenol die 45fache und bei Hexachlorophen die 840fache Menge erforderlich (Tab. 2).

Phenole	Polyäthylenglykol-MG			Polyäthylenglykol-MG-stearat		
	400	1000	2000	400	900	2200
	Erforderliche Vervielfachun (Faktor)					
Phenol	1	1	1	1,9	2,3	2,0
Kresol				4,3	4,9	4,1
o-Cl-m-Kresol	1,46	1,59	1,53	8,5	10	7
Thymol				39	34	18
o-Cl-m-Xylenol	1,88	2,02	2,08	42	45	26
Hexachlorophen	1	1	1	500	840	1000

Tab. 2 Erforderliche Vervielfachung der Phenolkonzentration zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Wirksamkeit in Gegenwart von Polyäthylenglykolen (5%) und Polyäthylenglykolstearaten (5%)

Daß es sich dabei nicht um Wertminderungen handelt, die auf eine Komplexbildung mit dem Polyäthylenglykolteil der Tenside zurückzuführen sind, geht daraus hervor, daß Wirkungseinbußen durch reines Polyäthylenglykol im mikrobiologischen Versuch kaum faßbar sind: In Anwesenheit der nicht mizellbildenden Polyäthylenglykole kann die ursprüngliche Aktivität z.B. von o-Cl-m-Kresol bereits durch Erhöhung der Wirkstoffkonzentration auf das 1,5fache wiederhergestellt werden, während der Ausgleich bei der gleichen Konzentration an Polyäthylenglykolstearat erst mit etwa der 10fachen Menge erreicht wird.

III. Untersuchungen über die Bindung zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolderivaten

1. Untersuchungen mit Hilfe der Diasolyse

Aus den mikrobiologischen Untersuchungen ergibt sich, daß nicht die chemischen Eigenschaften der untersuchten Tenside, sondern vielmehr das physikalisch-chemische Verhalten der Phenole von entscheidender Bedeutung für die antibakterielle Wertminderung ist. Zur Untersuchung der Bindungsvorgänge zwischen den Phenolen und den Polyäthylenglykolstearaten wurden Ergebnisse der Diasolyse, das UV-spektrophotometrische Verhalten sowie Fällungsreaktionen ausgewertet.

Bei den Bestimmungen mit Hilfe der Diasolyse trennt man Phenol- und Tensidlösung durch eine Gummimembran. Dabei vermögen nur die Phenole bis zur Einstellung des Gleichgewichts zu permeieren. Das Ausmaß einer Bindung an das Tensid

ergibt sich nach A.R.HURWITZ (44) durch analytische Aufarbeitung der Lösung in beiden Kammern.

Hinweise auf die Verteilung des Phenols zwischen Tensiden und Wasser erhält man durch Bestimmung des Verhältnisses

$$\frac{\text{Phenolkonzentration in Tensidlösung}}{\text{Phenolkonzentration in Wasser}} = \frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W}}$$

Trägt man diese Verteilungszahlen als Funktion der Tensidkonzentration auf, so erhält man Geraden, deren Steigung die Bindung des Arzneistoffs an die Tensidmizelle ausdrücken. In Abb. 9 und 10 sind solche Verteilungszahlen $\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W}}$ für o-Cl-m-Kresol und p-Cl-m-Xylenol, in Abb. 17 (s.S.53) für Hexachlorophen in Abhängigkeit von der Konzentration der Tenside Polyäthylenglykol-400,900,2200-stearat aufgezeichnet. Aus den gewählten Beispielen ergeben sich zwar unterschiedliche Affinitäten zu den drei verschiedenen Polyäthylenglykolstearaten, es ist aber nicht möglich, Gesetzmäßigkeiten abzuleiten. Diese Aussage wird auch durch Untersuchungen mit anderen Phenolen bestätigt, wie aus Tab. 3 hervorgeht. Hierbei ergeben sich nur geringe Bindungsunterschiede für Phenol, Kresol und o-Cl-m-Kresol; im Falle von Thymol wird die größte Affinität zu Polyäthylenglykol-400-starat gefunden; bei p-Cl-m-Xylenol ist das Bindungsvermögen an Polyäthylenglykol-900-stearat am größten: Polyäthylenglykol-2200-stearat wirkt sich auf Hexachlorophen am stärksten aus.

Große Bedeutung kommt den unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phenole zu. Dabei ergibt sich die

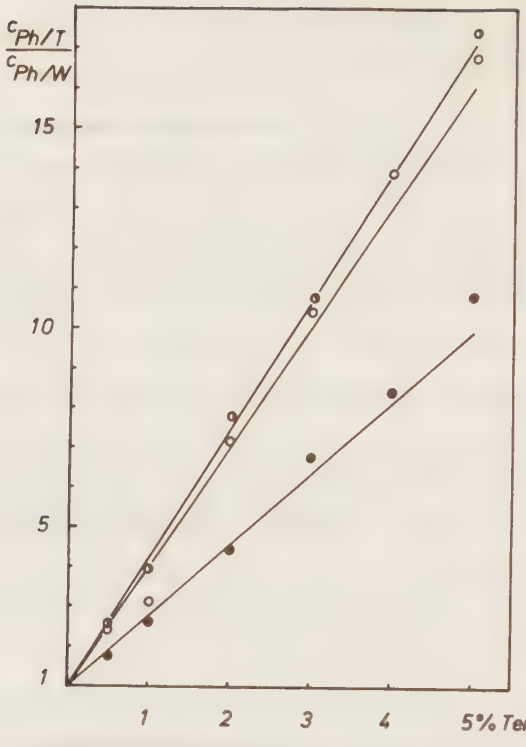


Abb. 9 Verteilungsverhältnis von o-Cl-m-Kresol zwischen Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen in Abhängigkeit von deren Konzentration (Phosphatpuffer 0,066m; pH 7,5; 37°C)

Polyäthylenglykol-MG-stearat	$\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W} \cdot c_T}$ (tanα)
—o— - 400-	3,2
—o— - 900-	3,4
—•— -2200-	1,98

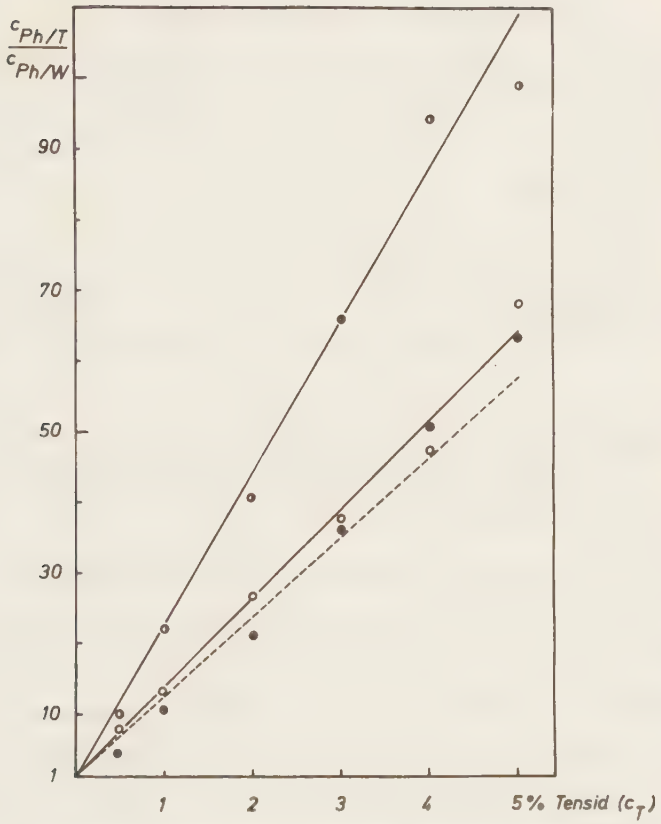


Abb. 10 *Verteilungsverhältnis von p-Cl-m-Xylenol zwischen Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen in Abhängigkeit von deren Konzentration (Phosphatpuffer 0,066m; pH 7,5; 37°C)*

Polyäthylenglykol -MG- stearat	$\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W} \cdot c_T}$ (tan α)
—o— -400-	12,8
—o— -900-	21,8
---•--- -2200-	11,6

Phenole	Verteilungsverhältnis in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration $\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W}\, c_T}$ (tanα)		
	Polyäthylenglykol-MG-stearate		
	MG 400	MG 900	MG 2200
Phenol	0,51	0,51	0,41
Kresol	1,0	0,9	0,68
o-Cl-m-Kresol	3,2	3,4	1,98
Thymol	15,4	9,2	6,0
p-Cl-m-Xylenol	12,8	21,8	11,6
Hexachlorophen	183	206	262

Tab. 3 Verteilungsverhältnis verschiedener Phenole zwischen Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen in Abhängigkeit von deren Konzentration (0,066m Phosphatpuffer; pH 7,5; 37°C)

gleiche Tendenz wie bei den mikrobiologischen Befunden: Zunehmend lipophiler Charakter der Phenole und Verstärkung der Wechselbeziehung entsprechen einander. So unterscheidet sich das Verteilungsverhältnis ($\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W}\, c_T} = \tan \alpha$) von Phenolen zwischen Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen vor allem durch das unterschiedliche hydrophil-lipophile Verhalten der Phenole. Im Falle des hydrophilen Phenols wurde bei Verwendung von Polyäthylenglykol-900-stearat ein tanα von nur 0,51 berechnet, bei den übrigen Arzneistoffen, die in dieser Reihenfolge zunehmend lipophile Eigenschaften aufweisen, steigen die Werte mit 0,9 für Kresol, 3,4 für o-Cl-m-Kresol, 9,2 für Thymol, 21,8 für p-Cl-m-Xylenol und 206 für das extrem lipophile Hexachlorophen an.

Der Einfluß des Polyäthylenglykolanteils ist ähnlich wie bei den mikrobiologischen Versuchen - von geringerer Bedeutung,

wirkt sich hier jedoch etwas stärker aus. Phenol, Kresol, o-Cl-m-Kresol und Thymol zeigen zu Polyäthylenglykol-400-stearat die größte, zu Polyäthylenglykol-900-stearat eine mittlere und zu Polyäthylenglykol-2200-stearat die jeweils geringste Affinität.

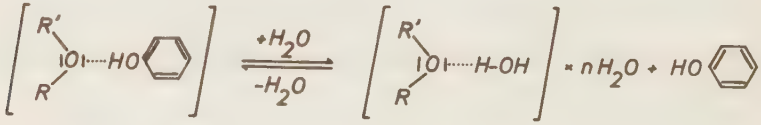
Abweichend verhalten sich p-Cl-m-Xylenol und Hexachlorophen. Bei diesen Substanzen ist die Bindung an Polyäthylenglykol-900-stearat (p-Cl-m-Xylenol) bzw. Polyäthylenglykol-2200-stearat (Hexachlorophen) am größten.

Die aufgefundene Affinität der Phenole zu den Polyäthylenglykolstearaten führt zu Assoziaten, die nur geringe Bindungsfestigkeit besitzen. Durch Diasolyse gegen fließendes Wasser konnten wir zeigen, daß die Bindung der untersuchten Phenole reversibel ist. In 5%iger Polyäthylenglykol-900-stearatlösung waren nach mehrwöchiger Diasolyse 4,7% (Phenol, Hexachlorophen), 1,2% (Kresol, p-Cl-m-Xylenol) sowie 0,19% (o-Cl-m-Kresol) der eingesetzten Substanzmenge auffindbar (Tabellen im experimentellen Teil s.S. 55). Gleiches trifft für Bindungen der Phenole an die Polyäthylenglykole zu; nach längerer Diasolyse von Polyäthylenglykol-1000-lösungen gegen fließendes Wasser läßt sich bei allen Phenolen praktisch kein Wirkstoff mehr nachweisen (Tabellen im experimentellen Teil s.S.55).

2. Untersuchung von Fällungsreaktionen zwischen den Reaktionspartnern

Die bisher durchgeführten Untersuchungen gingen davon aus, daß bei einem Überschuß an grenzflächenaktiven Polyäthylenglykolstearaten (1% bis 5%) geringe Phenolmengen (0,0005% bis 0,6%; vgl. Tab. 1, S. 6) solubilisiert waren. Ein Einfluß der hydrophilen Polyäthylenglykolgruppe des Tensidmoleküls läßt sich mit den genannten Untersuchungsmethoden nicht nachweisen. Dieser wird aber deutlich bei einer Veränderung der Konzentrationsverhältnisse. Ein Vergleich von Sättigungskonzentrationen der Phenole einerseits in Wasser, andererseits in Lösungen der Polyäthylenglykolstearate im Bereich der c_K liefert einen Einblick in die Vorgänge, die der Löslichkeitsvermittlung von Phenolen durch Polyäthylenglykolstearate vorausgehen.

Nach Tab. 4 besitzen die Reaktionsprodukte, welche sich über eine Protonen-Donator-Akzeptor-Wechselwirkung zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolteil der Tenside bilden (1, 15, 23, 18, 96), eine geringere Wasserlöslichkeit als die Phenole selbst.
Ein solcher Komplex



stellt ein labiles Gleichgewicht dar, wobei eine Fällung auftritt, wenn der phenolische Reaktionspartner in ausreichender Konzentration in der wässrigen Phase vorliegt.

Phenole		Polyäthylenglykol-MG-stearate			
		MG 900		MG 2200	
	$L_{Ph/W}$ [mol/l]	$L_{Ph/T}$ [mol/l]	$L_{Ph/W}:L_{Ph/T}$	$L_{Ph/T}$ [mol/l]	$L_{Ph/W}:L_{Ph/T}$
Phenol	0,905	0,061	15 : 1	0,087	10 : 1
Kresol	0,195	0,021	9 : 1	0,038	5 : 1
o-Cl-m-Kresol	0,0276	0,0046	6 : 1	0,0087	3 : 1
Thymol	0,0065	0,0024	2,5: 1	0,0026	2,5: 1

Tab. 4 Vergleich der Sättigungskonzentrationen verschiedener Phenole in Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen

$L_{Ph/W}$ = Sättigungskonzentration der Phenole in Wasser

$L_{Ph/T}$ = Sättigungskonzentration der Phenole in Polyäthylenglykolstearatlösungen (0,02% c_K)

Hinsichtlich der Sättigungskonzentrationen der Phenole einerseits sowie der gebildeten Komplexe andererseits zeichnet sich bei beiden Polyäthylenglykolderivaten die Tendenz ab, daß sich das Verhältnis

$$\frac{\text{Sättigungskonzentration der Phenole in Wasser}}{\text{Sättigungskonzentration der gebildeten Komplexe}} = \frac{L_{Ph/W}}{L_{Ph/T}}$$

mit zunehmender Lipophilie der Phenole verringert. Diese Reaktion zwischen Polyäthylenglykolderivaten und Phenolen verläuft nicht stöchiometrisch, denn dabei wären gleiche Verhältniszahlen vorauszusetzen.

Die Auswertung der Fällungsreaktionen (Tab. 4) ergibt Hinweise für den Verlauf der Lösungsvermittlung von Phenolen mit Polyäthylenglykolderivaten. Dabei kommt es zu zwei sich überlagernden Vorgängen: Primär bildet sich ein Komplex zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe und dem Äthersauerstoff des Polyäthylenglykolanteils. Erst danach kann der Einschluß des

lipophilen Reaktionsproduktes in die Mizelle erfolgen.

Wenn A. MITCHELL und R.ANDERSON (52,62,69) eine lineare Funktion zwischen Sättigung der Tensidmizelle und Sättigung der Wasserphase mit Solubilisat nachweisen, so gilt dies nur für Substanzen, wie z.B. Chlorbutol und Benzoesäure, bei denen eine Reaktion mit dem Tensidmolekül auszuschließen ist. Bei der Lösungsvermittlung der Phenole durch grenzflächenaktive Polyäthylenglykolderivate hat jedoch eine solche Reaktion mit der Polyäthylenglykolkomponente des Tensids eine Abweichung von dieser linearen Beziehung zur Folge.

Durch eine Komplexbildung mit Polyäthylenglykolderivaten ist das Verteilungsgleichgewicht gebundenes : freies Phenol zugunsten des gebundenen verschoben. Verglichen mit den Verhältnissen nach einer Lösungsvermittlung durch anionische Mizellbildner, z.B. Seifen (12, 13, 14, 18, 19), ist also der Anteil an freiem, wirksamem Phenol geringer und damit die Wertminderung größer.

3. Beeinflussung der UV-Spektren von Phenolen

Aufschlüsse über die Art der Wechselbeziehungen zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolstearaten haben wir auch über die Auswertung der spektralen Veränderungen erhalten. Dabei liegen die Mizellbildner mit 0,001 bis 10% gegenüber den Phenolen ($3 \cdot 10^{-4}$ bis $4 \cdot 10^{-5}$ m, entsprechend 1,6 bis 3 mg%) in großem Überschuß vor. Die Untersuchungsergebnisse machen deutlich, daß bei allen Phenolen - ausgenommen bei Phenol selbst - durch eine Tensidkonzentration von 1% eine Rotverschiebung der Absorptionsmaxima von 4 nm sichtbar wird, die auch durch Erhöhung der

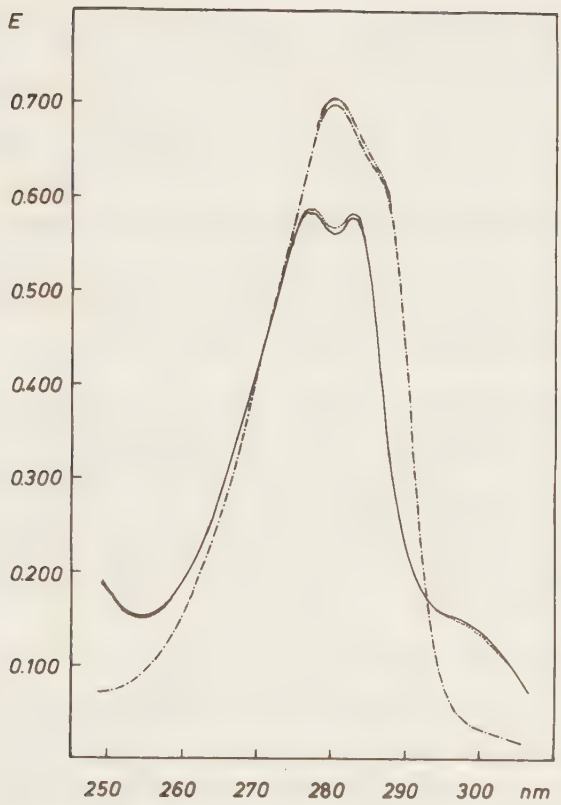


Abb.11 *Einfluß verschiedener Konzentrationen von Polyäthylenglykol-900-stearat auf das Absorptionsspektrum von o-Cl-m-Kresol (0,066m Phosphatpuffer; pH 7,5)*

——— *o-Cl-m-Kresol* $3 \cdot 10^{-4}$ *m*

Zusatz von Polyäthylenglyol-900-stearat in %

····· *0,001*

-·-·-· *1,0*

-··-··- *10,0*

Hilfsstoffkonzentration auf 10% keine Veränderung erfährt. Abb. 11 veranschaulicht an einem Beispiel den Einfluß der Polyäthylenglykolstearate auf die Absorptionsspektren von Phenolen. Danach hat Polyäthylenglykol-900-stearat in submizellarer Konzentration (0,010%) keinen Einfluß auf das Absorptionsspektrum von o-Cl-m-Kresol. Tensidkonzentrationen über 1% lassen eine Verschiebung der α-Bande von 4 nm erkennen. Außer der beobachteten Solvatochromie tritt eine Erhöhung der Extinktion auf.

In ähnlicher Weise wirkt sich der Einfluß der Polyäthylenglykolstearate (MG 900, 2200, 4700) auf die in unsere Untersuchungen einbezogenen Phenole aus (Tab. 5). Die drei Tenside verhalten sich bei der spektralphotometrischen Untersuchung der Wechselwirkung praktisch gleichartig.

Phenole	Absorptionsmaxima λ [nm]			$\Delta\lambda$ [nm]	
	Zusatz von Polyäthylenglykolstearat				
	-	1 %	10 %	1 %	10 %
Phenol	270	270	274	-	4
Kresol	272	276	276	4	4
o-Cl-m-Kresol	276,5	280,5	280,5	4	4
Thymol	274	278	278	4	4
p-Cl-m-Xylenol	278,5	282,5	282,5	4	4

Tab. 5 Einfluß von Polyäthylenglykolstearat auf die Lage der Absorptionsmaxima (α-Bande) verschiedener Phenole in wäßriger Lösung (0,066m Phosphatpuffer; pH 7,5)

Bei Phenol tritt diese Verschiebung des Absorptionsmaximums erst bei höherer Tensidkonzentration (10%) in Erscheinung.

Polyäthylenglykole verursachen erwartungsgemäß keine Veränderung der Phenolspektren. Eine Konzentration von 7,5% Polyäthylenglykol-1000, welche einer 10%igen Polyäthylenglykol-900_stearatlösung äquimolar ist, hat keinen bathochromen Einfluß auf die Phenolspektren.

Die positive Solvatochromie, der die UV-Spektren aller untersuchten Phenole unterliegen, bestätigt, daß ähnlich wie im Fall des Salicylsäurephenylesters (95) den hydrophoben Bereichen der Hilfsstoffe große Bedeutung zukommt. Diese Schlußfolgerung ist naheliegend, da reines Polyäthylenglykol sowie die Variation der Polyäthylenglykolanteile der Tenside die Phenolspektren nicht beeinflussen.

Die Verschiebung der Spektren beim Übergang der Phenolkomplexe in den Kohlenwasserstoffkern der Mizelle ist nach N.S.BAYLISS, H.A.STAAB und H.M.ROSENBERG (11, 81, 86) mit der Vergrößerung des Brechungsindex ($n_{Wasser} \prec n_{Stearinsäure}$) zu erklären. Die Gleichheit der spektralen Veränderung aller Phenole unter Einfluß der grenzflächenaktiven Polyäthylenglykolderivate könnte darauf zurückzuführen sein, daß die gebildeten Komplexe, welche lipophiler sind als die Phenole selbst, alle im inneren, hydrophoben Teil der Mizellen fixiert sind. Das im mikrobiologischen Versuch sowie bei den Untersuchungen über das Verteilungsverhalten zwischen Tensidmizelle und Wasser nachgewiesene differente Verhalten der Phenole ist wohl darauf zurückzuführen, daß hierbei das in der wässrigen Phase befindliche Phenol nach den Gesetzmäßigkeiten der Verteilung

erfaßt wird. Dagegen verzeichnet das Spektrogramm die Phenolkomponente im inneren lipophilen Teil der Mizelle.
Beobachtungen über die Einlagerung von Salicylsäurephenylester in Polyäthylenglykolderivatmizellen (95) ergänzen unsere Befunde. Auch hierbei dürfte die Fixierung im inneren Teil der Mizelle über einen Polyäthylenglykol-Phenol-Komplex erfolgt sein. Eine Lokalisierung lipophiler Substanzen in der polaren Palisadenschicht, wie sie A. RIEGELMAN und Mitarbeiter (77, 78) für Naphthalin folgern, ist unwahrscheinlich.

IV. Diskussion der Ergebnisse

Physikalisch-chemische Eigenschaften, mikrobiologische Untersuchungsergebnisse und Verteilungsverhalten der Phenole in Anwesenheit von Polyäthylenglykolderivaten beweisen, daß die antibakteriellen Wertminderungen der Konservierungsmittel auf Struktur und Verhalten der Reaktionspartner zurückzuführen sind.

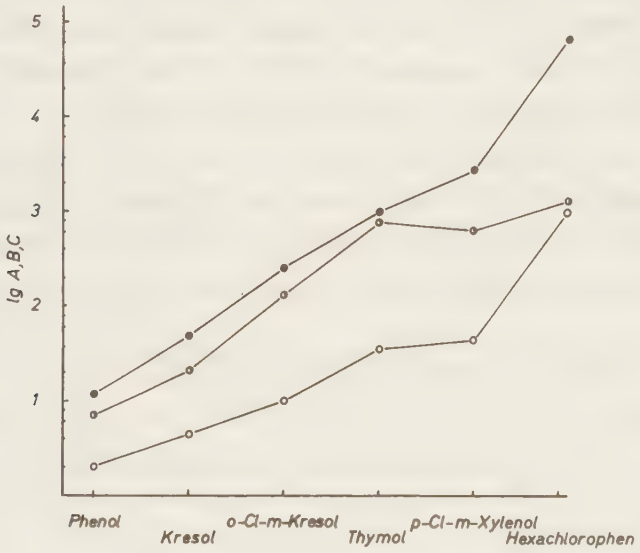


Abb.12 Übersicht über Wasserlöslichkeit ($\frac{1}{A}$), Verteilungskoeffizient (B) und Faktoren zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Wirkung (C) verschiedener Phenole.

●—● Kehrwert der Wasserlöslichkeit

o—o Verteilungskoeffizient $\frac{\text{Ölsäuredecylester}}{\text{Wasser}}$

○—○ Faktoren zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Wirksamkeit in Gegenwart von 5% Polyäthylenglykol-900-stearat

Aus der schematischen Darstellung (Abb. 12) wird deutlich, daß Wasserlöslichkeit, Verteilungskoeffizient und Ausmaß der Wertminderung durch Polyäthylenglykolderivate in Beziehung zu bringen sind: Mit zunehmender Lipophilie der Phenole - ausgedrückt durch Kehrwert der Wasserlöslichkeit und Verteilungskoeffizient Ölsäuredecylester/Wasser - erhöht sich das Ausmaß der Wertminderung durch Polyäthylenglykolderivate. So wird beispielsweise Phenol (Wasserlöslichkeit 8,5%; Verteilungskoeffizient 6,7) verhältnismäßig wenig in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt (errechneter Faktor 2,3), während Hexachlorophen (Wasserlöslichkeit 0,0014%; Verteilungskoeffizient 1300) einer starken Wirkungseinbuße unterliegt (errechneter Faktor 840).

Praktisch gleichartiges Verhalten zeigt sich, wenn man die Zahlenwerte für die Dosiserhöhung zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Aktivität (Faktoren) mit den Verteilungszahlen der Diasolyse-Versuche vergleicht. Das gilt vor allem dann, wenn

Phenole	Polyäthylenglykol-MG-stearat					
	MG 400		MG 900		MG 2200	
	A	B	A	B	A	B
Phenol	1,9	2,57	2,3	2,56	2,0	2,02
Kresol	4,3	4,98	4,9	4,48	4,1	3,4
o-Cl-m-Kresol	8,5	16	10	17	7	9,9
Thymol	39	77	34	46	18	30
p-Cl-m-Xylenol	42	64	45	109	26	58
Hexachlorophen	500	915	840	1030	1000	1310

Tab. 6 Übersicht über Faktoren zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Wirksamkeit (A) und Verteilungsverhalten (B) verschiedener Phenole in Anwesenheit von 5% Polyäthylenglykolstearat.

man wie im mikrobiologischen Versuch bei der Berechnung des Verteilungsverhältnisses ebenfalls 5%ige Hilfsstoffkonzentration zugrunde legt (Tab. 6). Die sehr ähnlichen Zahlen weisen die gleiche Tendenz auf. Daraus ist zu entnehmen, daß der Einfluß der Polyäthylenglykolderivate auf die antibakterielle Aktivität vom Verteilungsverhalten der Phenole zwischen Wasser und mizellarer Pseudophase gesteuert wird.

Mit unseren Untersuchungen über das spektrophotometrische Verhalten der Phenole sowie der Auswertung der Fällungsreaktion haben wir zeigen können, wie komplex die Wechselwirkungen zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolderivaten sind. Dabei konnte die zunächst unverständlich hohe Affinität - auch der stärker hydrophilen Substanzen Phenol und Kresol - zum hydrophoben Anteil der Mizelle durch Entstehen eines lipophilen Reaktionsproduktes erklärt werden. Entsprechend den Gesetzmäßigkeiten der Verteilung wird dadurch die Phenolkonzentration der wässrigen Phase zwangsläufig klein.

Substanzen, die wie Phenole mit Polyäthylenglykolen Komplexe bilden (Barbitursäuren, Sorbinsäure)(36, 42, 55, 58, 65, 67, 74), könnten nach ähnlichen Mechanismen solubilisiert werden.

V. Über die Verwendung nichtionischer Tenside als Lösungsvermittler phenolischer Desinfektionsmittel

Für die Praxis bieten lösungsvermittelte Phenole einen großen Vorteil gegenüber einfachen Phenollösungen, weil sie weniger empfindlich sind gegenüber Störreaktionen, wie z.B. durch Ei-

weiß (Sputum, Pus). Während wässrige Lösungen durch Bindung des Phenols an Eiweiß rasch unwirksam werden können, wird aus einer Tensidlösung dieses bis zur Einstellung des Gleichgewichts freigesetzt. Die Kapazität des Systems ist damit vergrößert worden (2). Die antibakterielle Aktivität bleibt dabei unter der Voraussetzung erhalten, daß das Phenoldepot in den Mizellen groß genug ist. Dieser Effekt tritt um so deutlicher in Erscheinung, je lipophiler die antibakterielle Substanz ist. Voraussetzung für die Verwendung solch solubilisierter Phenole wäre allerdings, daß die durch die Lösungsvermittler bedingte Wertminderung genau bekannt ist.

Aus dem Verteilungsverhalten des Wirkstoffs zwischen Mizelle und Wasserphase, das sich durch Versuche mit der Diasolyse und der WARBURG-Methode kennzeichnen läßt, kann die Höhe der Wirkungseinbuße eines Arzneistoffes berechnet werden. Voraussagen über die prozentuale Wirkungseinbuße bei einem bestimmten Gehalt an Lösungsvermittler sind möglich, wenn das Verteilungsverhalten (s.S.34) bekannt ist.

In einem Nomogramm lassen sich Verteilungsverhalten, Anteil an gebundenem Arzneistoff, Restaktivität und erforderliche Vervielfachung in eine direkte Beziehung bringen. Unter Zugrundelegung einer solchen Darstellung lassen sich bei Kenntnis des Verteilungsverhaltens alle anderen genannten Parameter für eine beliebige Tensidkonzentration zwischen 0 und 5% ablesen.

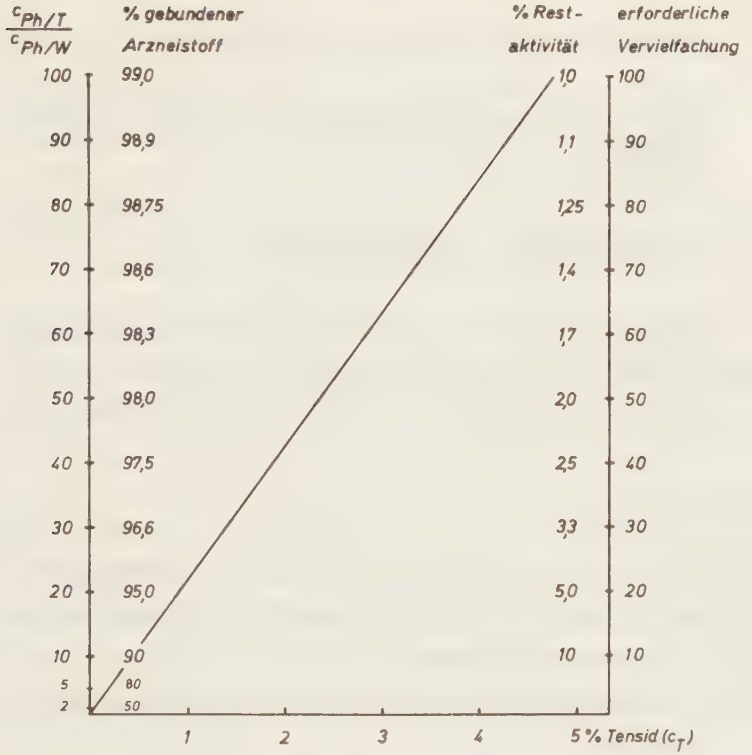


Abb.13 Nomogramm zur Berechnung von % gebundenem Arzneistoff, Restaktivität und erforderlicher Vervielfachung der Wirkstoffkonzentration im System p-Cl-m-Xylenol / Polyäthylenglykol-900-stearat

So ist es möglich, aus dem Nomogramm (Abb.13) aufgrund des Verteilungsverhaltens von p-Cl-m-Xylenol zwischen Polyäthylenglykol-900-stearat und Wasser (Tab.3) abzulesen, daß bei Verwendung von 1% Tensid als Lösungsvermittler 95,5% des Arzneistoffs an den Hilfsstoff gebunden werden. Daraus ergibt sich, daß die ursprüngliche Aktivität auf 4,5% gesunken ist und erst durch Erhöhung der Wirkstoffmenge auf das 21fache wieder hergestellt werden kann.

C. Experimenteller Teil

I. Mikrobiologische Untersuchungen mit Hilfe der WARBURG-Apparatur

1. Beschreibung der Versuchsanordnung

Die mikrobiologischen Untersuchungen mit Hilfe der WARBURG-Technik entsprechen hinsichtlich der Versuchsanordnung der von J.HIRSCH und H.LOMMEL (43, 57) erarbeiteten Methodik.

Keimsuspension:

Teststamm: Staph. aur. SG 511; Nährmedium: Standard-I-Nährbouillon (MERCK), sterilisiert; Keimzahl der beimpften Bouillon nach 24stündiger Bebrütung: 7,5 bis $9,5 \cdot 10^8$ Keime pro ml; durch Verdünnung (1:10) mit steriler Nährbouillon Bereitung der Keimsuspension .

Versuchslösungen:

Phenole sowie Gemische der Phenole mit Polyäthylenglykolen und Polyäthylenglykolstearaten im Nährmedium lösen; die Konzentration dieser Lösungen beträgt das Dreifache der Endkonzentration, da sich Versuchslösung und Keimsuspension während des Versuchs entsprechend verdünnen.

Arbeitstechnik:

In die sorgfältig gereinigten Reaktionsgefäße (Volumen 12,199-16,246 ml) werden in den Seitenarm 0,50 ml Testlösung,

in den Hauptraum 1,00 ml Keimsuspension und in den Einsatz 0,20 ml Kalilauge gegeben.

Das Gefäß für die Testkurve (ungehinderte Proliferation) enthält an Stelle der Versuchslösung im Seitenarm 0,50 ml sterile Nährbouillon. Durch die ungehinderte Keimvermehrung erhält man Aufschluß über den ordnungsgemäßen Verlauf des Ansatzes. Das Thermobarometer, das zur Korrektur von Luftdruck- und Temperaturschwankungen während des Versuchs dient, enthält 0,50 ml Versuchslösung im Seitenarm, 1,00 ml Nährbouillon im Hauptraum und 0,20 ml Kalilauge (15 %ig) im Einsatz. Die Reaktionsgefäße werden 10 bis 20 min unter Schüttelbewegung (80 Doppelschwingungen pro Minute, Schüttelweg 5 cm) bei $37^{\circ} \pm 0{,}05^{\circ}C$ mit offenen Kapillaren temperiert. Nach dem Schließen der Kapillaren die Druckänderung während 5 Std. jeweils nach 30 min ablesen. Unmittelbar nach der ersten Ablesung erfolgt die Überführung des Reaktionsgemisches aus dem Seitenarm in den Hauptraum.

Berechnung:
Der Sauerstoffverbrauch errechnet sich aus den abgelesenen Werten nach der Formel (74)

$$x = h \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{P_o}$$

x = verbrauchte Gasmenge [µl] (760 Torr; $0^{\circ}C$)
h = Druckänderung [mm] BRODIE'scher Lösung
V_G = Volumen des Gasraumes im Versuchsgefäß [µl]

T = $310^{o}K \pm 0,05^{o}$

V_F = Volumen der Flüssigkeit [µl]

α = BUNSEN'scher Adsorptionskoeffizient
(für Sauerstoff bei $310^{o}K$ $\alpha = 0,0024$)

P_o = Normaldruck [mm] BRODIE'scher Lösung
(10 000 mm BRODIE'scher Lösung = 760 Torr)

2. Aktivitätsbestimmung der Phenole in Anwesenheit von Tensiden

Zur Aktivitätsbestimmung antibakteriell wirksamer Substanzen sind verschiedene Methoden gebräuchlich. Sichere Ergebnisse liefern dabei Agardiffusionstest (89-91, 93, 94), Reihenverdünnungstest (30) sowie Untersuchungen mit der WARBURG-Apparatur (8, 51, 54, 79, 83, 85). Die ersten beiden Methoden lassen sich nicht immer anwenden, wenn Zubereitungen getestet werden, deren Vehikel nicht Wasser ist sondern eine andere Grundlage (wie z.B. Salben oder Emulsionen), oder wenn die wässrige Lösung pharmazeutische Hilfsstoffe enthält. Vor allem dann, wenn Arzneisubstanz und Hilfsstoff zu einem in Wasser schwer löslichen Komplex reagieren, sind Agardiffusions- und Verdünnungstest für eine exakte Aktivitätsbestimmung nicht anwendbar. Eine solche Reaktion liegt den Wechselwirkungen zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolen bzw. Polyäthylengykolderivaten zugrunde. Es ist daher notwendig, die Methodik der Aktivitätsbestimmung unserer Problemstellung anzupassen. Wir haben uns dabei eines Verfahrens bedient, bei dem die Absterbegeschwindigkeit von Mikroorganismen ermittelt wird. Die von

uns erarbeitete Technik ist der Methode von H. S. BEAN und H.BERRY (13, 14, 18, 19) vorzuziehen, weil sie differenzierte Aussagen über den Wirkungsverlust der Phenole in Abhängigkeit von verschiedenen Polyäthylenglykolen und Polyäthylenglykolderivaten erlaubt. Sie gestattet darüber hinaus die Erhaltung der gewünschten Aktivität durch eine gezielte Erhöhung der Phenolkonzentration.

Die antibakterielle Wirkung der Phenole kann nach der Einteilung von W.SCHULER dem Strahlentyp zugeordnet werden (84). Die Erhaltung dieses Wirkungstyps in Gegenwart von Polyäthylenglykolen bzw. Polyäthylenglykolstearaten ist Grundlage für die quantitative Erfassung einer Aktivitätsminderung (vgl. dazu Abb. 2, 8, 14). Die Methode beruht auf Ausgleich der Wirkungseinbuße durch Erhöhung der Arzneistoffkonzentration. Damit eröffnet sich die Möglichkeit eines direkten Vergleichs von Phenolkonzentrationen in hilfsstoffhaltigen und hilfsstofffreien Lösungen mit gleicher Wirksamkeit:

$$\text{Phenolkonzentration in hilfsstofffreier Lösung} \cdot F = \text{Phenolkonzentration in hilfsstoffhaltiger Lösung}$$

Dabei gibt der Faktor F die Vervielfachung der Phenolkonzentration an, die zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Wirksamkeit in Gegenwart des Hilfsstoffs erforderlich ist. Aus der Differenz zwischen den Phenolkonzentrationen in der hilfsstoffhaltigen und der hilfsstofffreien Lösung ergibt sich der Wirkungsverlust.

Abb. 14 zeigt in Ergänzung zu Abb. 8 des theoretischen Teiles Atmungskurven, denen Lösungen mit verschiedenen Kresolkonzentrationen ohne Hilfsstoff sowie nach Zusatz von 5 % an Polyäthylenglykol-900-stearat zugrundeliegen. In der Abbildung wird besonders deutlich, daß der Verlauf der Kurven - sowohl ohne als auch nach Zusatz des Hilfsstoffs - dem Strahlentyp entspricht. Solche strahlenförmigen Fächer lassen sich im bakteriostatisch/bakteriziden Grenzbereich für alle untersuchten Phenole erstellen. Aus den dafür benötigten Phenolkonzentrationen sind wie beschrieben (s.S. 18) die Faktoren zu errechnen.

Im Beispiel der Abb. 14 benötigt man in Gegenwart von 5 % an Polyäthylenglykol-900-stearat 1 % an Kresol, um eine gleichartige Absterberate zu erzielen wie mit einer 0,22%igen Kresollösung ohne Tensidzusatz. Daraus errechnet sich die erforderliche Vervielfachung der Arzneistoffkonzentration von F = 4,5 und ein Wirkungsverlust von 78 %. Die gleichen Zahlen erhält man bei der Auswertung des Kurvenpaares, dem Konzentrationen von 0,9 % Kresol in 5 %iger Tensidlösung sowie 0,20 % Kresol zugrundeliegen. Bei Berechnung des dritten Kurvenpaares kommt man zu einem Faktor von F = 5 und einem Wirkungsverlust von 80 %. Die Faktoren, die in Tab. 2 angegeben sind, stellen Mittelwerte dar, welche durch Auswertung der entsprechenden Fächer (im allgemeinen mindestens drei Kurvenpaare; doppelter Ansatz) erhalten werden.

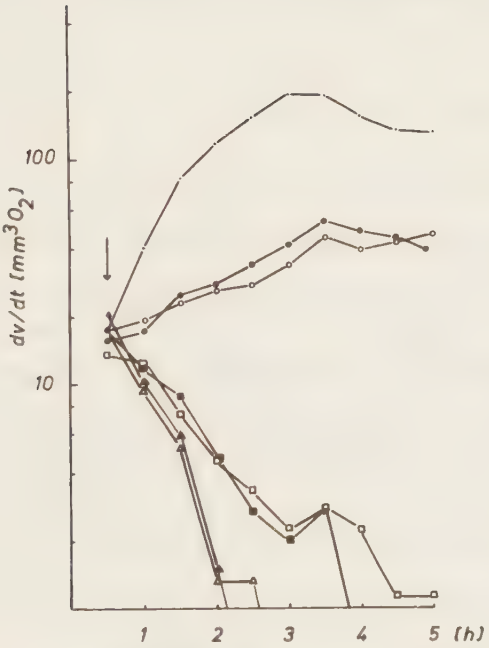


Abb. 14 Im Warburgversuch ermittelte, mikrobiologisch wirksame Konzentrationen von Kresol ohne Hilfsstoff und nach Zusatz von Polyäthylenglykol-900-stearat (5%)

—•— Proliferationskurve des Teststammes ohne Hilfsstoff

—○— Kresol 0,16 %

—□— Kresol 0,20 %

—△— Kresol 0,22 %

nach Zusatz von Polyäthylenglykol-900-stearat (5%)

—●— Kresol 0,8 %

—■— Kresol 0,9 %

—▲— Kresol 1,0 %

II. Untersuchungen zum Verteilungsverhalten der Phenole

Das Verteilungsverhalten von Substanzen zwischen lipophiler Phase und Wasser wird im allgemeinen durch den Verteilungskoeffizienten gekennzeichnet. Diesen haben wir bei den von uns in die Untersuchung einbezogenen Phenolen im System Ölsäuredecylester/Wasser bestimmt und damit die hydrophile-lipophile Ausrichtung unserer Arzneistoffmodelle charakterisiert. Die Verteilung der Phenole zwischen Wasser und mizellarer Pseudophase steht in Beziehung zu diesem Verhalten.

Die Bestimmung der Verteilung läßt sich durch Gleichgewichtsdialyse (9, 22, 37, 44), Gelfiltration (7, 41), potentiometrische Titration (32, 34, 75, 76) oder Löslichkeitsstudien (20, 21, 36, 59) durchführen. Wir haben das Verfahren der Gleichgewichtsdialyse im geschlossenen System mittels Gummimembran (38, 69) (Diasolyse) angewendet.

Erkenntnisse über die Reversibilität einer Komplexbildung zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolen bzw. Polyäthylenglykolstearaten lassen sich durch gemeinsame Dialyse der Reaktionspartner gegen fließendes Wasser gewinnen.

1. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten im System Ölsäuredecylester/Wasser

Versuchslösungen:
Lösungen von Phenol (0,03 - 0,5 %), Kresol (0,08 - 1 %) und o-Cl-m-Kresol (0,12 - 0,4 %) in Wasser (Phosphatpuffer

0,066 m; pH 7,5; Lösungen von Thymol (1,6 - 10 %), p-Cl-m-Xylenol (2 - 12 %) und Hexachlorophen (1,2 - 3,2 %) in Ölsäuredecylester.

Durchführung:
Schütteln von 10 ml Arzneistofflösung mit 10 ml Ölsäuredecylester bzw. Wasser (Phosphatpuffer 0,066 m; pH 7,5) in Schüttelröhrchen während 24 Stunden mit rotierender Bewegung um die Querachse des Rohres bei 37 $\pm$ 1°C. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugieren mit Hilfe der Ultrazentrifuge (100 000 g während 45 min; BECKMAN INSTRUMENTS, München; Rotor 40); photometrische Bestimmung in der wässrigen Phase (s.S.57).

Auswertung:
Errechnung des Verteilungskoeffizienten (Tab. 7) nach der Formel:

$$V_K = \frac{C_{Ph/Öl}}{C_{Ph/W}} = \frac{C_{Ph\ gesamt} - C_{Ph/W}}{C_{Ph/W}}$$

$C_{Ph/Öl}$ = Phenolkonzentration in der Ölphase
$C_{Ph/W}$ = Phenolkonzentration in der Wasserphase
$C_{Ph/ges}$ = insgesamt eingesetzte Phenolmenge

Phenole	V_K Olsäuredecylester / Wasser
Phenol	6,7
Kresol	20,3
o-Cl-m-Kresol	130
Thymol	773
p-Cl-m-Xylenol	634
Hexachlorophen	1300

Tab. 7 Verteilungskoeffizienten (V_K) verschiedener Phenole im System Olsäuredecylester/Wasser (Phosphatpuffer 0,066m ; pH 7,5 ; 37°C)

2. Gleichgewichtsdialyse im geschlossenen System

a) Diasolyse von Lösungen des Phenols, Kresols, o-Cl-m-Kresols, Thymols und p-Cl-m-Xylenols gegen Tensidlösung

Zur Abtrennung der Hilfsstoffe (Mol.Gew.680 - 2480) von den Phenolen (Mol.Gew. 94,11 - 406,92) sind poröse Membranen (z.B. auf Zellulose- und Silikatbasis) ungeeignet, da die Molekulargewichte von Hilfsstoff und Arzneisubstanz keine ausreichenden Größenunterschiede aufweisen. Die lipophilen

Gummimembranen jedoch sind durchlässig für die ebenfalls lipophilen Phenole, nicht aber für hydrophile Hilfssubstanzen und Wasser (69).

Membranen [+]:
5 x 5 cm^2, vor Verwendung mehrmals mit destilliertem Wasser gespült, 5-7 Tage gewässert.

Dialysierkammern:
Zweiteilige, zylinderförmige Zellen aus Glas, mittels Planschliff aufeinandergesetzt, mit Spiralfedern zusammengehalten (Abb. 15). Die Fixierung der Membran zwischen beiden Hälften dient gleichzeitig der Dichtung; Beschickung und Probenentnahme durch die mit Schliffstopfen versehenen seitlichen Öffnungen.

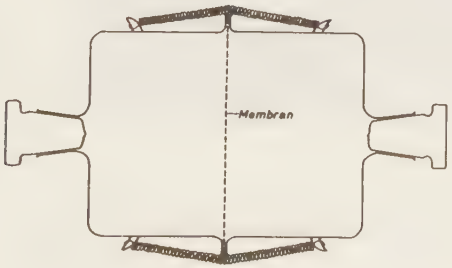


Abb. 15 Dialysierzelle

[+] Hersteller: HANSEATISCHE GUMMIWARENFABRIK, Bremen; Zusammensetzung: 95 % Kautschuk, 3 % Vulkanisiermittel, 2 % Paraffin, mit Maisstärke bestäubt.

Versuchslösungen:

Lösungen von Phenol (0,1 - 0,5 %), Kresol (0,22 %) o-Cl-m-Kresol (0,029 - 0,09 %), Thymol (0,07 - 0,1 %) und p-Cl-m-Xylenol (0,035 - 0,05 %) sowie Polyäthylenglykol-400,900,2200-stearat (0,5 - 5 %) in Phosphatpuffer (0,066 m; pH 7,5).

Abb. 16 Dialysierapparatur

Durchführung:

Füllung der Kammern mit je 15 ml Hilfsstoff- bzw. Arzneisubstanzlösung; Gleichgewichtseinstellung durch Drehbewegung der gefüllten Zellen auf einer rotierenden Trommel (12 Upm) (Abb. 16) während 60 bis 300 Stunden, entsprechend den Diffusionseigenschaften der verschiedenen Phenole;

Temperatur 37 ± 1°C; Bestimmung spektralphotometrisch (s.S.57) bzw. im Fall von p-Cl-m-Xylenol photometrisch (s.S.57) in den Lösungen beider Kammerhälften.

Auswertung:

Aus dem Quotienten

$$\frac{\text{Phenolkonzentration in der Tensidlösung}}{\text{Phenolkonzentration in der wässrigen Lösung}} = Q$$

läßt sich das Verteilungsverhältnis errechnen. Ist der Hilfsstoff - wie Polyäthylenglykol-400-stearat - nicht klar gelöst sondern dispergiert, so wird der Phenolgehalt nur auf der hilfsstofffreien Seite der Kammer bestimmt. Die Untersuchungen werden in einer Serie von doppelten Versuchsansätzen durchgeführt, die Fragestellungen wie "Verteilungsverhalten in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration" beinhalten. Die in den Abbildungen 9, 10 und 17 dargestellten Ergebnisse über das Verteilungsverhältnis der Phenole zwischen Wasser und Tensidlösungen errechnen sich jeweils aus den Mittelwerten dieser Untersuchungen

b) Diasolyse tensidhaltiger ^{14}C-Hexachlorophenlösungen gegen Wasser

In Bezug auf Membran und Dialysekammer entspricht die Gleichgewichtsdiasolyse mit Hexachlorophen der beschriebenen Anordnung (s.S. 47); das Löslichkeitsverhalten dieses Arzneistoffs erfordert allerdings hinsichtlich des Ansatzes von Untersuchungslösungen und der Auswertung eine Variation.

Die Löslichkeit des Hexachlorophen in Wasser bei Zimmertemperatur (23°C) haben wir mit 14,3 γ/ml (= 1: 70 000) bestimmt. Die ausgeprägt lipophile Substanz hat eine starke Affinität zur Gummimembran, so daß ein großer Teil der eingesetzten Untersuchungssubstanz in der Membran verbleibt. Dabei sinkt die Konzentration des Arzneistoffs soweit, daß eine quantitative Bestimmung nicht mehr möglich ist. Durch Verwendung von ^{14}C-Hexachlorophen lassen sich sehr geringe Mengen quantitativ bestimmen. Darüber hinaus haben wir durch eine Variation des Versuchsansatzes eine größere Sicherheit bei der Auswertung der Ergebnisse erreicht.

Versuchslösungen:
In je 100 ml der Tensidlösung (5%ig an Polyäthylenglykol-400,900,2200-stearat) unter Erwärmen eine geeignete Menge an ^{14}C-Hexachlorophen sowie Hexachlorophen bis zur Gesamtkonzentration von 400 mg % lösen; von diesen Stammlösungen mit Phosphatpuffer (0,066 m; pH 7,5) Verdünnungen in der Weise anlegen, daß Hilfsstoffkonzentrationen von 3 % und 1 % entstehen (Tab. 8).

Durchführung:
Beschickung der vorbereiteten Dialysezellen mit jeweils 15 ml dieser Lösungen und 15 ml Phophatpuffer (0,066 m; pH 7,5); Konzentrationsausgleich nach 300 Stunden; radiometrische Bestimmung in den Lösungen beider Kammerhälften (s.S.58)

Polyäthylenglykol- - MG -	stearat %	Hexachlorophen [mg %]	Imp·min^{-1}·ml^{-1}
	1	80	$0,628 \cdot 10^5$
- 400 -	3	240	$1,745 \cdot 10^5$
	5	400	$2,990 \cdot 10^5$
	1	80	$0,630 \cdot 10^5$
- 900 -	3	240	$1,493 \cdot 10^5$
	5	400	$2,815 \cdot 10^5$
	1	80	$0,649 \cdot 10^5$
- 2200 -	3	240	$1,685 \cdot 10^5$
	5	400	$2,760 \cdot 10^5$

Tab. 8 Gehalt und Impulsraten von Hexachlorophen in Tensidlösungen verschiedener Konzentration

Auswertung:

Berechnung der Quotienten wie unter a) (S.S.49).

Bei der Auftragung des Verteilungsverhältnisses in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration werden Geraden unterschiedlicher Steigung erhalten, bei denen, wie bereits im theoretischen Teil dargelegt, die größte Affinität des Hexachlorophen zum Polyäthylenglykol-2200-stearat auftritt. Die Berechnungsunterlagen für Abb. 17 liefert Tab. 9.

Polyäthylenglykol- -MG- - stearat [mg %] (C_T)		Hexachlorophen nach 300stündiger Dialyse Konzentration* in Tensidlösung ($C_{Ph/T}$) $Imp \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$	[mg %]	tensidfreiem Dialysat ($C_{Ph/W}$) $Imp \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$	[mg %]	$\frac{C_{Ph/T}}{C_{Ph/W}}$
	1	$0,528 \cdot 10^5$	45	$2,35 \cdot 10^2$	0,200	225
400-	3	$1,536 \cdot 10^5$	139	$2,93 \cdot 10^2$	0,268	520
	5	$2,592 \cdot 10^5$	347	$3,40 \cdot 10^2$	0,455	780
	1	$0,539 \cdot 10^5$	46	$2,75 \cdot 10^2$	0,233	196
-900-	3	$1,574 \cdot 10^5$	247	$2,88 \cdot 10^2$	0,464	532
	5	$2,634 \cdot 10^5$	376	$2,23 \cdot 10^2$	0,315	1190
	1	$0,494 \cdot 10^5$	71	$1,70 \cdot 10^2$	0,245	290
-2200-	3	$1,468 \cdot 10^5$	212	$1,87 \cdot 10^2$	0,269	790
	5	$2,434 \cdot 10^5$	350	$2,00 \cdot 10^2$	0,288	1230

Tab. 9 Verteilungsverhältnis - berechnet aus den Impulsraten - von Hexachlorophen zwischen Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen $\left(\frac{C_{Ph/T}}{C_{Ph/W}} \right)$ in Abhängigkeit von deren Konzentration (Phosphatpuffer 0,066 m ; pH 7,5 ; 37°C)

*Die angegebenen Zahlenwerte sind aus jeweils drei Meßwerten gemittelt

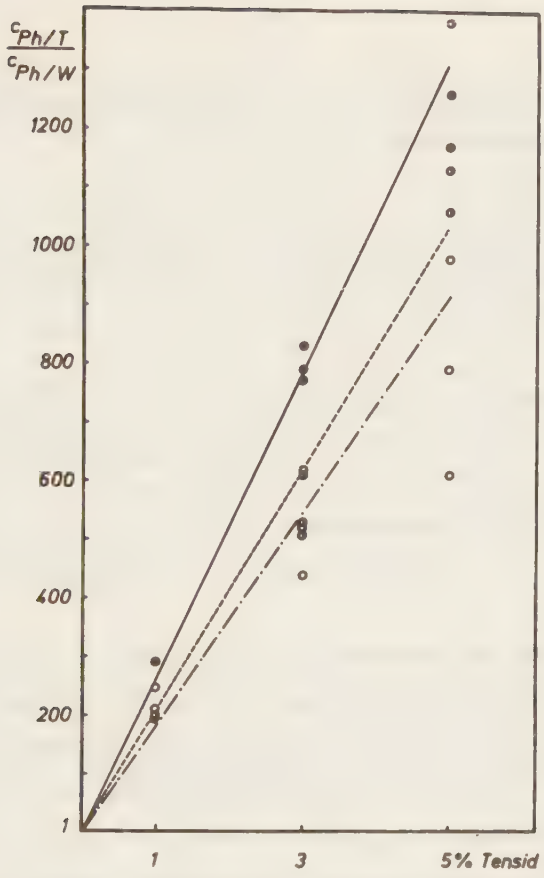


Abb. 17 Verteilungsverhältnis von Hexachlorophen zwischen Wasser und Polyäthylenglykolstearatlösungen in Abhängigkeit von deren Konzentration (Phosphatpuffer 0,066 m; pH 7,5; 37°C)

Polyäthylenglykol - MG - stearat		$\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W} \cdot c_T}$ (tanα)
—o—	-400-	183
—o—	-900-	206
—•—	-2200-	262

Die angegebenen Steigungen der Kurven (tanα) sind aus den Quotienten $\frac{c_{Ph/T}}{c_{Ph/W} c_T}$ in Anwesenheit von 1,3 und 5 % an Polyäthylenglykolstearat gemittelt.

3. Diasolyse phenolhaltiger Hilfsstofflösungen gegen fließendes Wasser

Dialysierkammer:

Gewaschene und gewässerte Dialysierschläuche[+)], Inhalt etwa 80 ml.

Versuchslösungen:

Je 50 ml der Phenole (Konzentrationen s. Tab. 10, 11) in wässrigen Lösungen von 5 % an Polyäthylenglykol-900-stearat bzw. 3,8 % an Polyäthylenglykol-1000.

Durchführung:

Einhängen der mit Untersuchungslösung gefüllten Dialysierschläuche in ein 5-Liter-Gefäß, dem ständig frisches Leitungswasser zugeführt wird. Nach 10-, 26- bzw. 54-tägiger Dialyse (s. Tab. 10, 11) erfolgt die photometrische Phenolgehaltsbestimmung (s.S. 57).

Der Wert für Hexachlorophen ist in der anfallenden, niedrigen Konzentration nicht exakt bestimmbar und kann lediglich als Höchstwert angesehen werden. Phenol diffundiert verhältnismäßig langsam durch die Membran und weist deshalb einen hohen Restgehalt auf.

+) Hersteller: HANSEATISCHE GUMMIWARENFABRIK, Bremen; Zusammensetzung s.S. 47

Phenole	Ausgangs-konzentration [mg %]	Restgehalt [mg %]	= % der Ausgangskonzentration
Phenol	1000	42	4,2
Kresol	500	5,8	1,16
o-Cl-m-Kresol	500	0,096	0,19
p-Cl-m-Xylenol	500	6,4	1,28
Hexachlorophen	500	21,4	4,2

Tab. 10 Phenolgehalt in 5%iger Polyäthylenglykol-900-stearatlösung nach 26tägiger Dialyse gegen fließendes Wasser

Phenole	Ausgangskonzentration [mg %]	Restgehalt in [mg %]	
		nach 10 Tagen	nach 54 Tagen
Phenol	94,1	4,72	0,108
Kresol	108,1	0,25	0,002
o-Cl-m-Kresol	142,6	0,12	
Thymol	150,2	0,108	0,005
p-Cl-m-Xylenol	156,6	0,056	0,008
Hexachlorophen	40,7	0,248	0,091

Tab. 11 Phenolgehalt in 3,8%iger Polyäthylenglykol-1000-lösung nach Dialyse gegen fließendes Wasser

III. Spektrographische Untersuchung von Phenolen in Anwesenheit der Tenside

Die Bestimmung der Absorptionsmaxima erfolgt in $3 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösungen von Phenol, Kresol, o-Cl-m-Kresol, Thymol und p-Cl-m-Xylenol bzw. $4 \cdot 10^{-5}$ molarer Lösung von Hexachlorophen in Phosphatpuffer (0,066 m; pH 7,5) gegen die Pufferlösung. Bei Anwesenheit von Polyäthylenglykolen und Polyäthylenglykolstearaten wird die Messung gegen die genannten Hilfsstofflösungen (Phosphatpuffer 0,066 m; pH 7,5) vorgenommen. Spektralphotometer (Typ DK 2A) der Fa. BECKMAN INSTRUMENTS, München.

IV. Durchführung von Fällungsreaktionen zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolstearaten

Die Fällung von Phenolen in wässriger Lösung wird durch Zugabe wässriger Lösungen von Polyäthylenglykol-900,2200-stearat vorgenommen[+)].

Vorlage von steigenden Mengen (5 bis 20 ml) einer Stammlösung von Phenol (2%ig), Kresol (2%ig), o-Cl-m-Kresol (0,3%ig) bzw. Thymol (0,1%ig) in Meßkolben von 100 ml Inhalt; Ergänzung mit Wasser auf 49,5 ml; Zugabe von 0,5 ml der 2%igen Hilfsstofflösungen (Gesamtkonzentration an Tensid 0,02 %); Schütteln bei 20 $\pm$ 0,5°C während 30 Minuten (Schüttelmaschine der Fa. EDMUND BÜHLER, Typ Sm6; 130 Schüttelbewegungen pro

[+)] Die Anordnung ist genau einzuhalten!

Minute; Amplitude 5 cm); Messung der Trübungswerte (LANGE-Kolorimeter "J"; Direkte Anzeige der Absorption unter Ausnutzung der maximalen Empfindlichkeit); (vgl. dazu Tab. 4).

V. Quantitative Bestimmung der verschiedenen Phenole

1. UV-spektrophotometrische Bestimmung

Meßlösungen:
Nach beendeter Gleichgewichtsdiasolyse werden die tensidfreien Lösungen 1:10, die tensidhaltigen 1:100 verdünnt.

Vergleichslösungen:
Phosphatpufferlösung (0,066 m; pH 7,5) ohne Wirk- und Hilfsstoff; im Diasolyseversuch unter gleichen Bedingungen mitgelaufen.

Gerät:
Spektralphotometer PMQ II der Fa. ZEISS, Oberkochen; Quarzküvetten, 1 cm Schichtdicke.

2. Photometrische Bestimmung

Die photometrische Bestimmung der Phenole wird vor allem zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten im System Ölsäuredecylester/Wasser herangezogen; sie erfolgt nach

der Methode von C.A. JOHNSON und R.A. SAVIDGE (46) bei den Wellenlängen 457 nm (Phenol), 456 nm (Kresol), 464 nm (o-Cl-m-Kresol), 454 nm (Thymol), 517 nm (p-Cl-m-Xylenol) und 486 nm (Hexachlorophen). (Spektralphotometer PMQ II der Fa. ZEISS, Oberkochen; Glasküvetten; 1 cm Schichtdicke).

3. Bestimmung von ^{14}C-Hexachlorophen in Anwesenheit von Polyäthylenglykolstearaten

Nach beendeter Gleichgewichtsdiasolyse werden die tensidfreien Lösungen unverdünnt, die tensidhaltigen Arzneistofflösungen 1:10 verdünnt (Azeton) in Mengen von 0,03; 0,04; 0,05 ml auf Zählplättchen (28·2 mm) aufgetragen (Zähldauer 10 min). (Methandurchflußzähler FH 49B; Zählrohr FH 411 der Fa. FRIESEKE & HÖPFNER GmbH, Erlangen-Bruck; Zählrohrspannung 2500 V; Eingangsempfindlichkeit 25 mV; Zählausbeute 17 %; Nulleffekt 13 - 16 Impulse pro Minute).

D. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht an einer Reihe phenolischer Konservierungsmittel mit unterschiedlichen antibakteriellen und physikalisch-chemischen Eigenschaften die Ursachen für die Wirkungseinbuße bei Wechselwirkungen mit nichtionogenen, grenzflächenaktiven Polyäthylenglykolstearaten.
Die mikrobiologischen und physikalisch-chemischen Befunde der Untersuchungen lassen eine Reihe von Schlußfolgerungen über Gesetzmäßigkeiten zu, die den wechselwirkungen zwischen Phenolen und Polyäthylenglykolderivaten zugrunde liegen:

1. Die Wertminderung der Phenole durch Polyäthylenglykolstearate ist abhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Reaktionspartner.
2. Die chemische Reaktion mit Polyäthylenglykolen wirkt sich auf die antibakterielle Aktivität der Phenole práktisch nicht oder nur geringfügig aus.
3. Für das Ausmaß der Wertminderung kommt den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phenole wesentlich größere Bedeutung zu, als denen der Polyäthylenglykolstearate.
4. Zunehmende Lipophilie der Phenole erhöht die Wertminderung durch Polyäthylenglykolstearate.
5. Die antibakterielle Wirkung von Phenolen kann in Gegenwart von Polyäthylenglykolstearaten aufrecht erhalten werden, wenn das Ausmaß der Bindung bekannt ist und die Konzentration der Konservierungsmittel entsprechend erhöht wird.
6. Die über mikrobiologische Untersuchungen (WARBURG-Apparatur; Staph.aur. SG 511) berechneten Dosiserhöhungen,

welche zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Wirkung erforderlich sind, entsprechen den durch Gleichgewichtsdiasolyse ermittelten Bindungsverhältnissen Konservans/Hilfsstoff.

Den Diasolyseansätzen mit Hexachlorophen liegt dabei ^{14}C-markierte Substanz zugrunde.

7. Die erforderliche Vervielfachung zur Aufrechterhaltung der antibakteriellen Aktivität beträgt in 5%igen Polyäthylenglykolstearatlösungen bei den verschiedenen Phenolen durchschnittlich 2 (Phenol), 4(Kresol), 8(o-Cl-m-Kresol), 30(Thymol), 38(p-Cl-m-Xylenol), 800(Hexachlorophen).

8. Fällungsreaktionen und UV-spektralphotometrische Befunde beweisen, daß die Wechselwirkung von Phenolen mit Polyäthylenglykolstearaten auf zwei sich überlagernde Vorgänge zurückzuführen ist; primär:Bildung eines Komplexes zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe und dem Äthersauerstoff des Polyäthylenglykolanteils über Wasserstoffbrücken, welche zu einer Ausfällung führen kann; sekundär: Lösungsvermittlung des lipophilen Komplexes.

9. Die Komplexbildung führt in der Regel kaum zu einer Beeinflussung der antibakteriellen Wirksamkeit. Für die starke Beeinträchtigung der antibakteriellen Wirkung ist hingegen der zweite Reaktionsvorgang von entscheidender Bedeutung: Durch Eintritt des komplex gebundenen Phenols in den hydrophoben Kern der Mizelle wird das Konservierungsmittel weitgehend der wässrigen Phase entzogen.

10. Die Annahme von M. BARR (10), A.H. BECKETT (16) und W.B.BREUNINGER (26), wonach die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des Phenols und dem Äthersauerstoff der Polyäthylenglykolkomponente die Wertminderung verursachen soll,trifft nicht zu.

11. Die Bindung der Phenole an Polyäthylenglykolstearate ist reversibel und vom Verteilungsgleichgewicht des Konservans zwischen Wasser- und Mizellphase abhängig.

12. Bei Kenntnis dieses Gleichgewichtes können Wirkungsverlust, Restaktivität und die erforderliche Konzentrationserhöhung des Wirkstoffs für jede Tensidkonzentration berechnet werden.

E. Literaturverzeichnis

1. ÅGREN,A. und R.ELOFSSON, Acta pharmac.Suecica 4, 281 (1967)
2. ALLAWALA,N.A. und S.RIEGELMAN, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit.42, 267 (1953)
3. ALLAWALA,N.A. und S.RIEGELMAN, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit.43, 93 (1954)
4. ANDERSON,R.A. und K.J.MORGAN, J.Pharmacy Pharmacol. 18, 449 (1966)
5. AOKI,M., A.KAMATA und T.MATSUZAKI, J.pharmac.Soc.Jap. 77, 410 (1957)
6. AOKI,M., A.KAMADA, M.MATSUMOTO, K.HASEGAWA und Y.ISA J.pharmac.Soc.Jap. 77, 1071 (1957)
7. ASHWORTH,R.W. und D.D.HEARD, J.Pharmacy Pharmacol., Suppl. 18, 98S (1966)
8. AUHAGEN,E., Arzneimittel-Forsch. 12, 754 (1962)
9. BAHAL,C.K. und H.B. KOSTENBAUDER, J.pharmac.Sci. 53, 1027 (1964)
10. BARR,M. und L.F.TICE, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 46, 445 (1957)
11. BAYLISS, N.S. und E.G.McRAE, J.physic.Chem. 58, 1002 (1954)
12. BEAN,H.S., Pharmac.Acta Helvet. 35, 512 (1960)
13. BEAN,H.S. und H.BERRY, J.Pharmacy Pharmacol. 3, 639 (1951)

14. BEAN,H.S. und H.BERRY, J.Pharmacy Pharmacol. 5, 632 (1953)

15. BEAN,H.S. und A.DAS, J.Pharmacy Pharmacol., Suppl. 18, 107S (1966)

16. BECKETT,A.H. und A.E.ROBINSON, Soap, Perfum.Cosmet. 31, 454 (1958)

17. BELLINGER,H. Tenside 2, 295 (1965)

18. BERRY,H. und A.BRIGGS, J.Pharmacy Pharmacol. 8, 1143 (1956)

19. BERRY,H., A.M.COOK und B.A.WILLS, J.Pharmacy Pharmacol. 8, 425 (1956)

20. BLAUG,S.M. und S.S.AHSAN, J.pharmac.Sci. 50, 138 (1961)

21. BLAUG,S.M. und S.S.AHSAN, J.pharmac.Sci. 50, 441 (1961)

22. BLAUG,S.M. und A.G.RICH, J.pharmac.Sci, 54, 30 (1965)

23. BOLLE,A. und A.MIRIMANOFF, J.Pharmacy Pharmacol. 2, 685 (1950)

24. BOLLE,A. und A.MIRIMANOFF, Pharmac.Acta Helvetiae 26, 284 (1951)

25. BOLLE,A. und A.MIRIMANOFF, Pharmac.Acta Helvetiae 27, 31 (1952)

26. BREUNINGER,W.B. und R.W.GOETSCH, J.pharmac.Sci. 54 1487 (1965)

27. BROWN,M.R.W., J.Soc.Cosmet.Chemists 17, 185 (1966)

28. BROWN,M.R.W., J.Pharmacy Pharmacol, Suppl. 16, 51T (1964)

29. CHAKRAVARTY,D.C. und J.L.LACH, Drug Standards 27, 6 (1959)

30. COOK,A.M. und K.J.STEEL, J.Pharmacy Pharmacol. Suppl.11, 157T (1959)

31. DELUCA,P. und H.B.KOSTENBAUDER, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 49, 430 (1960)

32. DONBROW,M. und C.T.RHODES, J.Pharmacy Pharmacol. 17, 258 (1965)

33. ERLANDSON,A.L.,jr. und C.A.LAWRENCE, Science 118, 274 (1953)

34. EVANS,W.P., J.Pharmacy Pharmacol. 16, 323 (1964)

35. FERGUSON,J., Proc.Roy.Soc. (London), Ser. B. 127 387 (1939)

36. GOODHARDT,F.W. und A.N.MARTIN, J.pharmac.Sci. 51, 50 (1962)

37. GRAHAM,H.D. und L.B. THOMAS, J.pharmac.Sci. 51, 988 (1962)

38. GUTTMAN,D. und T.HIGUCHI, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 45,659 (1956)

39. HALL,S. und M.G.deNAVARRE, Proc.sci. Section Toilet Goods 27, (1) 1957

40. HAUSCHILD,F., Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie, Leipzig 1956

41. HERRIES,D.G., W.BISHOP und F.M.RICHARDS, J.physic.Chem. 68, 1842 (1964)

42. HIGUCHI,T. und J.LACH, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 43, 465 (1954)

43. HIRSCH,J., Rev.Fac.Sci.Univ. d'Istanbul, nouv.Série, 1, 45 (1936)

44. HURWITZ,A.R., P.P.DELUCA und H.B.KOSTENBAUDER, J.pharmac. Sci 52, 893 (1963)

45. JERCHEL,D. und H.OBERMEIDEN, Angew.Chem. 67, 145 (1955)

46. JOHNSON,C.A. und R.A.SAVIDGE, J.Pharmacy Pharmacol., Suppl. 10, 171T (1958)

47. JUDIS,J., J.pharmac.Sci. 51, 261 (1962)

48. JUDIS,J., J.pharmac.Sci. 52, 126 (1963)

49. JUDIS,J., J.pharmac.Sci. 53, 196 (1964)

50. KABADI,B.N. und E.R.HAMMARLUND, J.pharmac.Sci. 55, 1072 (1966)

51. KLEINZELLER,A., Manometrische Methoden, Jena 1965

52. KOSTENBAUDER,H.B., Amer.Perfumer Aromatics 75, 28 (1960)

53. KRASNEC,L., Acta Fac.pharmac.Bohemoslovenicae 11, 7 (1965)

54. KRAUSHAAR,A., Arzneimittel-Forsch. 9, 736 (1959)

55. LACH,J.L., K.RAVEL und S.M.BLAUG, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 46, 615 (1957)

56. LANG,R., Dissertation Univ.München 1967

57. LOMMEL,H., Arzneimittel-Forsch. 5, 176 (1955)

58. MARCUS,A.D., Drug Cosmet.Ind. 79, 456 (1956)

59. MATSUMOTO,M. und M.AOKI, Chem.pharmac.Bull. (Tokyo) 10, 251 (1962)

60. MATSUMOTO,M. und M.AOKI, Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 10, 260 (1962)

61. MITCHELL,A.G. und K.F.BROWN, J.Pharmacy Pharmacol. 18, 115 (1966)

62. MIYAWAKI,G.M., N.K.PATEL und H.B.KOSTENBAUDER, J.Amer. pharmac.Assoc., sci.Edit.48, 315 (1959)

63. MOSER,B., Dissertation Univ.München 1960

64. MULLEY,B.A. und A.D.METCALF, J.Pharmacy Pharmacol. 8, 774 (1956)

65. De NAVARRE, M.G. und H.E.BAILEY, J.Soc.Cosmet.Chemists 7, 427 (1956)

66. NOGAMI,H., S.AWAZU und N.NAKAJIMA, Chem.pharmac.Bull. (Tokyo) 10, 503 (1962)

67. NUPPENAU,H., Arch.Pharmac. og Chem. 67, 1033 (1960)

68. PARKER,M.S. und M.BARNES, Soap, Perfum. Cosmet. 40, 163 (1967)

69. PATEL,N.K. und N.E. FOSS, J.pharmac.Sci. 53, 94 (1964)

70. PATEL,N.K. und N.E. FOSS, J.pharmac.Sci. 54, 1495 (1965)

71. PATEL,N.K. und H.B. KOSTENBAUDER, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 47, 289 (1958)

72. PISANO,F.D. und H.B.KOSTENBAUDER, J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 48, 310 (1959)

73. RATH,H., Tenside 2, 1 (1965)

74. RAUEN, H.M., Biochemisches Taschenbuch, Berlin 1956

75. RHODES,C.T. und M.DONBROW, J.pharmac.Sci. 54, 1130 (1965)

76. RHODES,C.T. und M.DONBROW, J.pharmac.Sci. 54, 1069 (1965)

77. RIEGELMAN,S., J.Amer.pharmac.Assoc., sci.Edit. 49, 339 (1960)

78. RIEGELMAN,S., N.A.ALLAWALA, M.K.HRENOFF und L.A.STRAIT, J.Colloid Sci. 13, 208 (1958)

79. RITZERFELD,W., Arzneimittel-Forsch., 10, 48 (1960)

80. ROMBACH,R., Dissertation Univ. München 1967

81. ROSENBERG,H.M. und D.HALE, J.phys.Chem. 69, 2490 (1965)

82. SASAKI,W. und S.G.SHAH, J.pharmac.Sci. 54, 277 (1965)

83. SCHOOG,M. Arzneimittel-Forsch. 10, 524 (1960)

84. SCHULER,W., Experientia 2, 316 (1946)

85. SOUS,H., H.LÖSCHNER, F.LAGLER und H.MÜCKTER, Arzneimittel-Forsch. 11, 396 (1961)

86. STAAB,H.A., Einführung in die theoretische organische Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962

87. SYKES,G. Desinfection and Sterilization, London 1965

88. THOMA,K.,Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges., 300, 31 (1967)

89. THOMA,K., E.ULLMANN und E.WOLFERSEDER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsch.pharmaz.Ges. 295, 548 (1962)

90. THOMA,K., E.ULLMANN und G.ZELFEL, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 295, 670 (1962)

91. ULLMANN,E., K.THOMA und B.MOSER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 294, 94 (1961)

92. ULLMANN,E. und B.MOSER, Vorträge Orig.fass. III.Intern. Kongr.grenzflächenaktive Stoffe, Köln 1960, Sekt. D, 271

93. ULLMANN,E. und K.THOMA, Arzneimittel-Forsch. 9, 644 (1959)

94. ULLMANN,E. und K.THOMA, Pharmaz.Ztg.-Nachr. 104, 1110 (1959)

95. ULLMANN,E., K.THOMA und R.ROMBACH, Pharmazie 22, 700 (1967)

96. WAILES,L., J.pharmac.Sci. 51, 165 (1962)

97. WEDDERBURN,D.L., Advances in pharmac.Sci. 1 195 (1964)

Lebenslauf

Otto Friedrich Rudolf Fickel	geboren am 5. 4. 1937 in Berlin als erstes zweier Kinder des Dipl.-Ing. Ernst Fickel und seiner Ehefrau Maria geb. Müller
Schulbildung:	1944-1945 Volksschule in Berlin-Adlershof 1946-1956 humanistisches Gymnasium in Berlin W 35
Reifeprüfung:	20. 2. 1956 in Berlin W 35
Berufsausbildung:	
Pharmazeutisches Praktikum:	1. 4.1956 bis 31. 3. 1958 Hohenstaufen-Apotheke in Berlin
Pharmazeutisches Vorexamen:	19. 3. 1958 in Berlin
Studium der Pharmazie:	SS 1958 und WS 1958/59, Technische Universität Berlin; SS 1959 bis WS 1960/61, Freie Universität Berlin
Pharmazeutisches Staatsexamen:	25. 4. 1961
Kandidatenzeit:	Mai 1961 bis September 1961, Lazarus-Apotheke in Berlin SW 29; Oktober bis Dezember 1961, Elvira-Apotheke in München
Bestallung als Apotheker:	27. 9. 1963 in Berlin

Wissenschaftliche Arbeit:	Januar 1962 bis Dezember 1966 unter der Anleitung von Frau Professorin Dr. E.Ullmann am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, Direktor:Professor Dr. Dr.hc. E. Bamann
Berufliche Tätigkeit:	Seit 1. 11. 1964 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, Direktor: Professor Dr. Dr. hc. E. Bamann